

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

**Un modèle de la maladie de Lenègre, les
souris *Scn5a*^{+/-} :
étude du canal ionique Nav1.5
et
des miRNAs régulateurs.**

THÈSE DE DOCTORAT

École doctorale : BIOLOGIE-SANTÉ
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Anne BOURGÉ

Le 26 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

- Président:** Mme Patricia LEMARCHAND, Professeur des Universités,
INSERM U915, Université de Nantes, Nantes.
- Rapporteurs:** M Jean-François FAIVRE, Professeur des Universités,
CNRS UMR6187, Université de Poitiers, Poitiers
M Jean-Yves LE GUENNEC, Professeur des Universités,
INSERM U637, Université de Montpellier-2, Montpellier
- Examineur:** M Alexandre MEZGHRANI, Chargé de Recherche,
CNRS UMR5203, Université de Montpellier, Montpellier
- Directeurs de thèse:** M Jean MEROT, Chargé de Recherche,
INSERM U915, Université de Nantes, Nantes
M Flavien CHARPENTIER, Directeur de Recherche,
INSERM U915, Université de Nantes, Nantes.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	II
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	IV
INDEX DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
AVANT PROPOS	8
INTRODUCTION	10
1. Les canaux sodiques potentiel-dépendants.....	10
1.1 La famille des canaux sodiques potentiel-dépendants.....	10
1.2 Le mécanisme de résistance à la TTX.....	11
1.3 Structure des canaux.....	11
1.4 Le canal sodique Nav1.5.....	13
2. Le canal cardiaque	16
2.1 L'activité électrique du cœur	16
2.2 Les canalopathies	20
3. Les modèles de souris	31
4. Synthèse et régulation du canal Nav1.5	41
4.1 Synthèse du canal Nav1.5	41
4.2 Les protéines de régulation.....	45
4.3 Les miRNAs.....	53
OBJECTIFS DE LA THESE :	61
ETUDE DU CANAL NAV1.5	63
1. Résultats.....	63
1.1 Choix du modèle cellulaire approprié : cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés.....	64
1.2 Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les cardiomyocytes.....	66
1.3 Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les HEK-Nav1.5	68
1.4 La sous-unité Bêta 1 ne modifie pas la demi-vie de Nav1.5	70
1.5 L'expression membranaire de Nav1.5 dans les cardiomyocytes est stable... ..	71
1.6 La stabilité membranaire des canaux Nav1.5	72
1.7 L'interaction Ankyrine G –Nav1.5	75
2. Discussion.....	79
2.1 La biosynthèse de Nav1.5.....	79
2.2 La stabilité du canal à la membrane.....	80
2.3 Le modèle cellulaire	83
ETUDE DES MIRNAS DANS LES CŒURS DE SOURIS SCN5A^{+/-}	86
1. Résultats.....	86
1.1 Etude des miRNAs dans des jeunes souris	86
1.2 Etude des miRNAs cardiaques à partir de souris adultes.....	98
1.3 Les miRNAs de la fibrose	105
2. Discussion.....	106
2.1 Utilisation des résultats de TLDAs au détriment des puces	106
2.2 L'expression cardiaque de miR-133a et miR-1.....	108
2.3 Sur-expressions de miRNAs dans les souris adultes avec des troubles de la conduction.....	109
2.4 La sur-expression de miR-574-3p.....	110
2.5 Les miRNAs de la fibrose	113
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS.....	115

MATERIEL ET METHODES	118
1. Etude de Nav1.5.....	118
1.1 Culture cellulaire	118
1.2 Biochimie.....	121
1.3 Analyses d'images et calcul de la demi-vie	127
1.4 Exploitation des résultats.....	128
2. Etudes des miRNAs	129
2.1 Modèle murin.....	129
2.2 Electrocardiographie des souris <i>Scn5a</i> ^{+/-}	129
2.3 Préparation des ARNs.....	130
2.4 Dosage des ARNs.....	131
2.5 La qualité des ARNs.....	131
2.6 Les puces Agilent.....	131
2.7 Analyse des miRNAs par TLDA.....	134
2.8 Statistiques.....	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
ANNEXE : LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE	154

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Structure moléculaire d'un canal sodique voltage-dépendant (ici le canal Nav1.5).	12
Figure 2: Potentiels d'action des myocytes cardiaques.....	18
Figure 3 : Représentation de l'activité électrique du cœur au cours d'un battement donné par le tracé d'un ECG de surface.....	19
Figure 4 : Conséquences d'un retard d'inactivation du courant sodique sur le PA.....	23
Figure 5 : Représentation des ECGs des 3 types de syndrome Brugada.....	24
Figure 6 : repolarisation prématurée des myocytes ventriculaires du myocarde sous-épicaudique.	26
Figure 7: Synthèse des protéines membranaires.	42
Figure 8: Les protéines partenaires liées à Nav1.5 sont différentes en fonction de la ..localisation de la protéine (Meadows et Isom 2005).....	46
Figure 9: Représentation schématique du canal Nav1.5 et de ses protéines partenaires avec leurs zones d'association.	47
Figure 10: La calmoduline liée à l'extrémité C-terminale de Nav1.5.....	51
Figure 11 : Biogénèse et fonction des miRNAs.	56
Figure 12 : les différents modes d'appariements des miRNAs sur leurs ARNm cibles.	57
Figure 13: Descriptif des souris <i>Scn5a^{+/-}</i>	62
Figure 14 : Isolement et survie des cardiomyocytes de souris en culture.....	64
Figure 15 : Expression de Nav1.5 dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture. ..	66
Figure 16: Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les cardiomyocytes	68
Figure 17: Détermination de la demi-vie de Nav1.5 dans des HEK.	69
Figure 18: La sous-unité β_1 ne modifie pas la demi-vie de Nav1.5.....	70
Figure 19: Etude de la stabilité de la fraction membranaire de Nav1.5	72
Figure 20: Le canal Nav1.5 est très stable à la membrane.	74
Figure 21 : L'interaction de Nav1.5 avec l'ankyrine G est-elle phosphorylation dépendante de la caséine kinase II ?.....	76
Figure 22 : L'expression de l'ankyrine G dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture.	77
Figure 23: L'inhibition de la CK II ne modifie pas l'expression membranaire de Nav1.5.	78
Figure 24: Classification hiérarchique des miRNAs en fonction des 24 échantillons de ventricules gauches de souris sauvages ou <i>Scn5a^{+/-}</i>	90

Figure 25: miR-1 et miR-30a sont exprimés différemment dans les ventricules gauches des souris avec des intervalles QRS supérieurs à 17 ms.....	92
Figure 26: Expression des miRNAs cardiaques des souris âgées de sept semaines mise en évidence par TLDA.....	97
Figure 27: Expression des miRNAs dans les cœurs de souris adultes.....	103
Figure 28 : Expression de miR-23a dans les cœurs de souris adultes.....	104
Figure 29 : Expression des miRNAs de la fibrose dans les cœurs de souris adultes.....	105
Figure 30 : Schéma du principe de la biotinylation	126
Figure 31 : Paramètres mesurés sur un ECG (Royer <i>et al.</i> 2005).....	130
Figure 32 : oligonucléotides hybridés sur lame de verre, puce Agilent (d'après www.chem.agilent.com).....	132
Figure 33 : les signaux obtenus à partir des puces.	133
Figure 34 : Rétrotranscription et amplification en temps réel des miRNAs grâce à la technique <i>TaqMan</i>	135
Figure 35 : Carte microfluidique permettant l'analyse simultanée de 335 miRNAs par PCR <i>TaqMan</i>	136
Figure 36 : Courbes d'amplification d'ADNc en temps réel.....	136
Figure 37 : graphe de comparaison de la moyenne des Ct<32 avec les Ct des références.....	137

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Canaux sodiques voltage-dépendants.	11
Tableau 2 : Classification des syndromes des QT-longs congénitaux et les gènes associés.....	22
Tableau 3 : Caractéristiques des animaux de sept semaines étudiés par puce Agilent	87
Tableau 4 : MiRNAs les plus exprimés dans le cœur de souris détectés par les puces Agilent.....	89
Tableau 5 : Caractéristiques des animaux adultes.	98
Tableau 6 : Les miRNAs les plus exprimés dans les cœurs de souris adultes mis en évidence par TLDA.....	100
Tableau 7 : Cibles de miR-574-3p prédites par le site TargetScan.	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BDM	2,3-butanedione monoxime
BSA	Bovine Serum Albumin, Sérum d'Albumine Bovine
CamKII	Calmoduline Kinase II
Kir	canal potassique à rectification entrante
Kv	canal potassique dépendant du potentiel
CKII	Caséine Kinase II
Cx43	Connexine 43
Ica	courant calcique
Ina	courant sodique
DTT	Dithiothréitol
FHF1B	Fibroblast growth factor Homologous Factor 1B, facteur 1 homologue au facteur de croissance des fibroblastes
GPD1-L	Glycérol-3-Phosphate Pésyhydrogénase 1 Like
HSP70	Heat Shock Protein, protéine de choc thermique de 70kDa
HERG	human Ether-a-gogo Related Gene
Igg	Immunoglobuline
IP	Immunoprécipitation
KO	KnockOut
PBS	Phosphate Buffer Saline, tampon phosphate salin
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PKP2	PlaKoPhiline_2
PM	Poids Moléculaire
PA	Potentiel d'Action
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PTPH1	Protéine Tyrosine Phosphatase 1
TfnR	Récepteur à la Transferrine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RE	Réticulum Endoplasmique
SVF	Sérum de Veau Foetal
SRP	Signal Recognition Particule, particule de reconnaissance du signal
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
BrS	Syndrome de Brugada
JLN	Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen
LQTS	Syndrome du QT Long
TLDA	<i>TaqMan</i> Low Density Array
TTX	Térodotoxine
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween, tampon Tis
VGSC,	
Nav	Voltage Gated Sodium Channel, canaux sodiques dépendants du potentiel
WB	Western Blot

AVANT PROPOS

L'unité INSERM U915, dans laquelle j'ai effectué ce travail de thèse, s'intéresse, entre autres, aux troubles du rythme cardiaque liés aux canaux ioniques. Ces troubles du rythme sont responsables de morts subites chez l'adulte, ce qui représente 5 à 10 % des décès par an en France.

La maladie de Lenègre est une maladie dégénérative fréquente caractérisée par des troubles progressifs de la conduction cardiaque au cours du vieillissement pouvant conduire à des syncopes et à un risque de mort subite. Pour l'heure, il n'existe pas de traitement préventif de cette maladie nécessitant à terme l'implantation d'un stimulateur cardiaque. Ainsi sur 50.000 poses de stimulateurs par an en France, 50% sont implantés chez des patients souffrant de cette pathologie. Afin de pouvoir mettre en place des traitements pharmacologiques de prévention ou de traitement, nous étudions les protéines impliquées dans les troubles de la conduction.

De nombreuses mutations du canal sodique majoritaire dans le cœur, Nav1.5, ont été retrouvées chez des patients souffrant de cette maladie. Pour comprendre l'implication du canal Nav1.5 dans cette pathologie, j'ai travaillé sur un modèle de souris invalidée (*knockout*) à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* (souris *Scn5a*^{+/-}). Ces souris, comme l'homme, développent des troubles de la conduction plus ou moins marqués. En effet, au sein d'une même fratrie, deux phénotypes se distinguent:

- **un phénotype « sévère »**, caractérisé par un ralentissement sévère de la conduction ventriculaire associé, au cours du vieillissement à l'apparition d'une fibrose importante et un risque élevé de tachycardie ventriculaire;
- **un phénotype « mineur »**, caractérisé par une vitesse de conduction ventriculaire normale ou légèrement ralentie sans apparition de fibrose ou de troubles du rythme au cours du vieillissement. Ces souris présentent la même quantité d'ARNm de *Scn5a* que les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » (50% *versus* les souris sauvages), mais ont une expression protéique de Nav1.5 plus élevée (75% chez ces souris, 50% chez les souris avec un phénotype « sévère » *versus* les souris sauvages).

Ces souris montrent que la sévérité du phénotype est directement liée à une diminution de l'expression de la protéine Nav1.5 et qu'un autre mécanisme régulant l'expression de la protéine, indépendant de la mutation, est en défaut chez les animaux souffrant des troubles de la conduction les plus sévères.

L'objectif de mon travail a donc été de comprendre la différence de phénotype entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et celle avec un phénotype « sévère ».

Le premier objectif de mon travail de thèse était d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la biosynthèse et le trafic du canal Nav1.5 à la surface de la membrane plasmique des cardiomyocytes.

Le second objectif était de mettre en évidence les miRNAs exprimés dans les cœurs des souris *Scn5a*^{+/-}, pouvant expliquer la différence phénotypique.

La partie introductive de ce document a pour but de présenter les canaux sodiques et plus particulièrement Nav1.5 dans le cœur, son implication dans les canalopathies et dans le cancer. Le mécanisme de synthèse et de régulation des miRNAs dans le cœur est également décrit en fin d'introduction.

INTRODUCTION

1. Les canaux sodiques potentiel-dépendants

1.1 La famille des canaux sodiques potentiel-dépendants

Les canaux sodiques potentiel-dépendants (VGSCs, Voltage Gated Sodium Channel) sont des protéines transmembranaires perméables uniquement aux ions sodium lorsqu'ils sont activés par modification du potentiel membranaire. Les VGSCs ont été isolés en 1984 chez le poisson *Electrophorus electricus* et dans le cœur de poulet grâce à leur sensibilité à la tétrodotoxine, TTX (Lombet et Lazdunski 1984; Rosenberg *et al.* 1984). En 1989, les ADNs de quatre isoformes de canaux sodiques ont été isolés du cerveau de rat (Noda *et al.* 1986) et ce n'est qu'en 1992 que l'isoforme cardiaque humain a été isolé (Gellens *et al.* 1992).

Aujourd'hui dix isoformes des canaux sodiques sont référencés (Tableau 1). Ces canaux ont la particularité d'avoir de grandes similitudes et d'être très bien conservés entre les espèces. Les gènes codants pour ces canaux sont répartis sur quatre chromosomes différents :

- les gènes des canaux Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.7 et Nav1.8 (canal n'ayant aucune fonction identifiée pour l'heure) sont localisés sur le chromosome 2 ;
- les gènes des canaux Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 sont localisés sur le chromosome 3 ;
- les gènes des canaux Nav1.4 et Nav1.6 sont respectivement sur les chromosomes 11 et 15.

Les canaux issus du même chromosome présentent une grande homologie. Les canaux du chromosome 2 sont principalement neuronaux et sensibles à la TTX (à des concentrations nanomolaires). Nav1.8 et Nav1.9 sont aussi majoritairement neuronaux mais Nav1.5 est cardiaque et ils sont tous les trois résistants à la TTX (blocage à des concentrations micromolaires). Le canal Nav1.6, principalement neuronal et le canal des muscles squelettiques, Nav1.4, sont sensibles à la TTX (Goldin 2001)¹.

¹ Comme nous le verrons ultérieurement, les canaux sodiques sont exprimés dans différents tissus, mais ici ne sont répertoriés que les tissus où ils sont majoritairement exprimés.

1.2 Le mécanisme de résistance à la TTX

La résistance à la TTX résulte de la présence d'un acide aminé polaire (cystéine ou sérine) à la place d'un acide aminé aromatique (tyrosine ou phénylalanine) dans la séquence TMQDXWE (où X est l'acide aminé en jeu), dans la région du pore entre les segments S5-S6, du domaine 1. Cet acide aminé interagirait avec la surface hydrophobe de la molécule de TTX (Plummer et Meisler 1999). Par ailleurs, la sérine présente dans les canaux Nav1.8 et Nav1.9 permet une plus forte résistance à la TTX par rapport aux canaux Nav1.5 résistant par la présence d'un résidu cystéine (Yu et Catterall 2003).

Tableau 1 : Canaux sodiques voltage-dépendants.

Nom du canal	Gène	Localisation chromosomique	Sensibilité à la Tetrodotoxine	Tissus d'expression majoritaire
Nav1.1	SCN1A	2	X	CNS,PNS
Nav1.2	SCN2A	2	X	CNS,PNS
Nav1.3	SCN3A	2	X	CNS,PNS
Nav1.4	SCN4A	17	X	muscle squelettique
Nav1.5	SCN5A	3		cœur
Nav1.6	SCN8A	12	X	CNS,PNS
Nav1.7	SCN9A	2	X	PNS
Nav1.8	SCN10A	3		PNS
Nav1.9	SCN11A	3		PNS
Nax	SCN6/7A	2	non fonctionnel	Glia

Localisation chromosomique, distribution tissulaire et sensibilité à la TTX. PNS: système nerveux périphérique; CNS: système nerveux central.

1.3 Structure des canaux

Les VGSCs sont composés d'une sous-unité fonctionnelle α de 260 kDa et d'une sous-unité régulatrice β de 30 kDa (qui est détaillée dans la partie 4.2)².

La sous-unité α est une protéine monomérique formée par quatre domaines (DI-DIV) homologues constitués chacun de six segments transmembranaires (S1-S6). Les domaines sont reliés entre eux par des boucles intracellulaires, des « linkers ». Les extrémités N-terminale et C-terminale sont cytoplasmiques (Figure 1).

² Par abus de langage, la sous-unité α fonctionnelle est assimilée au VGSC, la sous-unité régulatrice n'étant pas indispensable à sa fonction.

Aucune structure 3D n'a pu être réalisée à ce jour. Toutefois, en s'appuyant sur la grande homologie de séquence dans la région du pore avec les canaux potassiques, cristallisés en 1998 (Doyle *et al.* 1998), il est supposé que le pore des VGSCs est assuré par la juxtaposition des segments S5-S6 des quatre domaines, permettant une filtration spécifique des ions sodium. Cette partie forme la boucle P. La boucle P correspond plus particulièrement à l'association des quatre boucles peptidiques reliant les hélices transmembranaires S5 et S6 de chaque domaine. Une partie de la boucle P est transmembranaire, c'est cette partie qui assure le rôle de filtre.

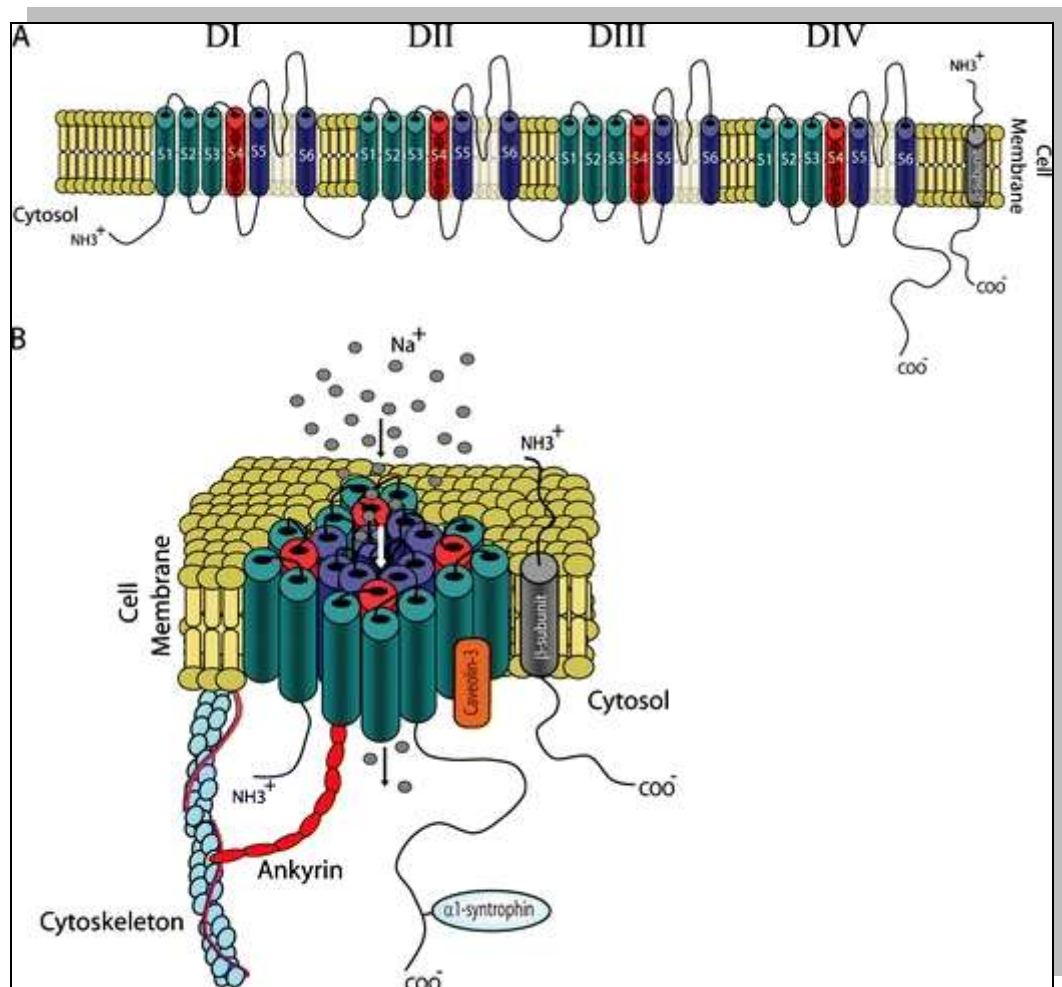


Figure 1: Structure moléculaire d'un canal sodique voltage-dépendant (ici le canal Nav1.5).

La sous-unité α est constituée de domaines (DI-DIV) contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1-S6); les segments S4 sont chargés positivement et donnent au canal sa sensibilité au potentiel (voltage-sensors). La sous-unité β , est formée par un segment transmembranaire.

Les quatre domaines de la sous-unité α se regroupent autour d'un pore permettant la conduction des ions. Ce pore est relié par les boucles extracellulaires situées entre les segments S5-S6,

formant la boucle P. La protéine Nav1.5 est stabilisée à la membrane grâce à des protéines partenaires décrites dans le paragraphe 4.2. (Amin *et al.* 2010)

La sensibilité du canal au potentiel est assurée par le « voltage sensor », qui résulte de l'enchaînement d'acides aminés chargés positivement tous les trois résidus dans les segments S4 de chaque domaine (Yu et Catterall 2003).

Les domaines d'inactivation des canaux sodiques et potassiques sont totalement différents. Des études fonctionnelles ont montré qu'un motif situé dans la boucle intracellulaire (1488-1490) reliant les domaines DIII-DIV joue un rôle clé dans l'inactivation rapide des VGSCs (West *et al.* 1992). Pour comprendre l'implication de ce motif IFM (I, Isoleucine, F, Phénylalanine, M, Méthionine), dans l'inactivation des VGSCs, la structure d'un peptide correspondant à la boucle intracytoplasmique DIII-DIV a été établie par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution. Cette étude montre que la méthionine permet le positionnement de la porte d'inactivation face au pore, conduisant ainsi à une interaction directe de la phénylalanine avec le pore. L'isoleucine intervient dans le maintien de l'environnement hydrophobe de la séquence IFM et un autre résidu thréonine en position 1491, interviendrait aussi dans ce mécanisme d'inactivation : le motif alors mis en jeu dans l'inactivation des VGSC serait IFMT (Rohl *et al.* 1999).

Les canaux sodiques paraissent très semblables. Toutefois ils ont une distribution dans les tissus et des propriétés électrophysiologiques spécifiques. Il est donc important d'étudier ces isoformes séparément afin de mieux comprendre leur régulation et de pouvoir par la suite les cibler spécifiquement.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au canal sodique voltage-dépendant Nav1.5.

1.4 Le canal sodique Nav1.5

1.4.1 Les isoformes de Nav1.5

Chaque isoforme Nav est soumis à l'épissage alternatif, conduisant à l'expression de nombreux isoformes issus d'un même gène. Par exemple pour le gène *SCN5A* (codant pour Nav1.5), cinq isoformes différents ont été identifiés chez l'Homme. Ces isoformes semblent avoir une répartition dépendant du tissu :

- Nav1.5f, forme non fonctionnelle, ayant dix-huit acides aminés délétés suite à l'excision de l'exon 24, est exprimée dans de nombreux tissus mais est absente

du cœur. Cet isoforme représente 50 % des canaux Nav1.5 dans le cerveau (Schroeter *et al.* 2010) ;

- Nav1.5d, caractérisé par une délétion de quarante acides aminés dans la boucle intracellulaire DII-DIII, a une fonction non encore établie. Cet isoforme serait exprimé préférentiellement au niveau du faisceau de His et semblerait privilégier la conduction du potentiel d'action (PA) cardiaque (Camacho *et al.* 2006; Schroeter *et al.* 2010) ;
- Nav1.5c, est la forme variante de Nav1.5 majoritaire dans le cœur représentant 35 % des transcrits, suivant le ratio d'expression Nav1.5 :Nav1.5c de 2 :1. Cette forme est exprimée également dans le cerveau. Nav1.5c semble aussi être majoritaire dans une lignée de cellules de neuroblastome (Makielski *et al.* 2003; Ou *et al.* 2005; Schroeter *et al.* 2010). Cet isoforme possède un résidu glutamine supplémentaire en 1077 ce qui abolit un site de phosphorylation prédictif pour la caséine kinase II (Kerr *et al.* 2004). Electrophysiologiquement, aucune différence n'a été observée dans les courants enregistrés issus des canaux Nav1.5 et ceux de Nav1.5c. Cependant une étude récente montre une augmentation du courant sodique tardif issu de Nav1.5 chez des patients souffrant du syndrome de Brugada et cette augmentation n'est pas retrouvée avec les canaux Nav1.5c (Schroeter *et al.* 2010) ;
- nNav1.5 ou Nav1.5e, la forme néonatale de Nav1.5, est exprimée dans le cœur néonatal, dans le cerveau et dans les cellules cancéreuses adultes (Fraser *et al.* 2005; Ou *et al.* 2005; Schroeter *et al.* 2010; Wang *et al.* 2009). Cette forme a été identifiée en 1991, à partir du canal Nav1.2 (Sarao *et al.* 1991). Elle se distingue de la forme adulte par des acides aminés différents dans les segments transmembranaires S3:S4 du domaine DI (sept acides aminés différents entre Nav1.5 et nNav1.5), ce qui leur confère des propriétés électrophysiologiques différentes. Ces deux isoformes résultent de l'expression alternée de deux exons. Dans la forme néonatale, l'expression de l'exon 6 est remplacée par un autre exon, l'exon 6a alors que dans la forme adulte, l'exon 6a est épissé, seul l'exon 6 est exprimé (Sarao *et al.* 1991).

Nav1.5 est exprimé dans des cellules excitables telles que les neurones et les cardiomyocytes, mais aussi dans des cellules non excitables telles que les astrocytes (Black *et al.* 2010) et les cellules cancéreuses où il semble jouer un rôle fondamental.

1.4.2 Nav1.5 et cancer

A partir des années 90, les courants sodiques, calciques et potassiques ont été identifiés dans des lignées de cellules cancéreuses, comme dans les lignées issues de carcinomes pulmonaires à petites cellules (Pancrazio *et al.* 1989), ou du cancer de la prostate (Grimes *et al.* 1995; Laniado *et al.* 1997). Plus récemment, Nav1.5 a été identifié dans des lignées de cellules issues du cancer du sein ou de l'ovaire (Fraser *et al.* 2005; Gao *et al.* 2010; Roger *et al.* 2003).

Les VGSCs jouent un rôle clé dans le pouvoir métastatique de ces tumeurs. Plus elles expriment les VGSCs, plus elles sont invasives, quel que soit l'isoforme exprimé (Grimes *et al.* 1995; Smith *et al.* 1998). Dans les lignées cellulaires issues du cancer de la prostate, c'est le canal Nav1.7 qui participe à l'invasion des cellules alors que dans les cellules malignes du cancer du sein c'est le canal Nav1.5 sous sa forme néonatale.

Le mécanisme par lequel ces canaux modulent l'invasion cellulaire reste encore à élucider. Cependant, il a été mis en évidence que l'activité des canaux joue directement sur l'invasion cellulaire et modifie l'environnement de ces cellules (Roger *et al.* 2004). Ainsi l'activité électrique des VGSCs modifie l'homéostasie sodique, diminue le pH périmembranaire ce qui favorise ainsi l'activité d'enzymes protéolytiques, les cathepsines cystéines qui sont directement impliquées dans l'invasion cellulaire (Gillet *et al.* 2009; Roger *et al.* 2004). Cette modification du gradient sodique conduit aussi à une augmentation de la sécrétion et de l'endocytose dans les cellules malignes (Mycielska *et al.* 2003).

Ainsi, les VGSCs ont une place importante encore mal définie dans l'invasion des cellules cancéreuses mais ne semblent pas être les seuls acteurs en jeu. Récemment la sous-unité régulatrice $\beta 1$, connue pour ses importantes interactions avec la matrice extracellulaire et son rôle dans l'adhésion cellulaire a été décrite dans une lignée de cellules du cancer du sein (Chioni *et al.* 2009).

Ces travaux sur les cellules cancéreuses ont permis d'établir une relation claire entre les canaux sodiques et la matrice extracellulaire et vraisemblablement avec les facteurs environnementaux, tels que les hormones. Ainsi, il a été observé dans plusieurs études que les hommes affectés par le syndrome de Brugada (ce syndrome est détaillé en 2.2.2) sont aussi plus susceptibles de développer un cancer de la prostate, suggérant une implication de la testostérone dans le développement de ce cancer (Haruta *et al.* 2009).

2. Le canal cardiaque

Nav1.5 est à l'origine du courant dépolarisant initiant le potentiel d'action (PA) dans le cœur. La localisation des canaux Nav1.5 à des positions stratégiques à la surface des cardiomyocytes principalement au niveau des disques intercalaires, sur les membranes latérales et en quantité plus restreinte au niveau des tubules-T (où sont principalement exprimés des canaux sodiques « neuronaux ») facilite la conduction du PA.

La propagation du PA cardiaque de cardiomyocyte à cardiomyocyte assure l'activation électrique du cœur qui est directement reliée à sa contraction par le mécanisme de couplage excitation-contraction. La conduction du PA est donc responsable du rythme cardiaque dont toute perturbation est mise en évidence sur un tracé d'électrocardiogramme (ECG).

2.1 L'activité électrique du cœur

2.1.1 Les cardiomyocytes et les canaux ioniques

Le cœur est un muscle dont l'activité repose sur des cellules musculaires, les cardiomyocytes. Ces cellules allongées, multinucléées génèrent et conduisent l'onde de dépolarisation responsable de la contraction cardiaque. Ce mécanisme est assuré par des protéines transmembranaires exprimées à la surface des cardiomyocytes, les canaux ioniques.

Ces canaux contrôlent les échanges d'ions entre les milieux intra et extracellulaires, de façon sélective. En effet, chaque canal est spécifique à un ou deux ions. L'activation de ces canaux résulte dans la création du PA cardiaque.

2.1.2 Le potentiel d'action cardiaque

Le PA cardiaque reflète l'activité des différents canaux présents dans le cœur. La répartition de ces canaux n'étant pas homogène dans le cœur, le potentiel enregistré diffère selon la localisation cardiaque (cf Figure 2).

Le PA cardiaque se découpe en cinq phases (Nerbonne et Kass 2005):

- phase 0 : représente la dépolarisation rapide du PA. Dans les cellules myocardiques cette phase est rapide et liée à l'activation des canaux sodiques à l'origine du courant entrant I_{Na} . Au niveau du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire ce sont les canaux calciques qui participent à la génération du PA (Lei *et al.* 2007)
- phase 1 : repolarisation transitoire reflétant dans les fibres de Purkinje et dans les myocytes atriaux et ventriculaires, l'inactivation des canaux sodiques et l'activation de canaux potassiques assurant un courant sortant transitoire $I_{to,f}$ (canaux Kv4.2/Kv4.3) et $I_{to,s}$ (canaux Kv1.4).
- phase 2 : le plateau résulte de la compétition des courants calciques entrants $I_{Ca,L}$ avec les courants potassiques sortants. Ce plateau est plus marqué dans les myocytes ventriculaires, car les canaux potassiques présents dans les oreillettes et dans les ventricules ne sont pas les mêmes et ont donc des propriétés électrophysiologiques différentes.
- phase 3 : repolarisation de la membrane assurée par les courants potassiques sortants, les canaux calciques étant inactivés.
- phase 4 : maintien du potentiel de repos par le courant I_{K1} dans les cellules non automatiques. Dans les cellules automatiques du nœud sinusal ou du nœud auriculo-ventriculaire et dans les cellules du réseau de conduction de His et de Purkinje, il n'y a pas de potentiel de repos. Ces cellules sont caractérisées par une pente de dépolarisation diastolique due à la désactivation des courants potassiques et à l'activation du courant I_f et des courants calciques de type T, dans un premier temps, puis L.

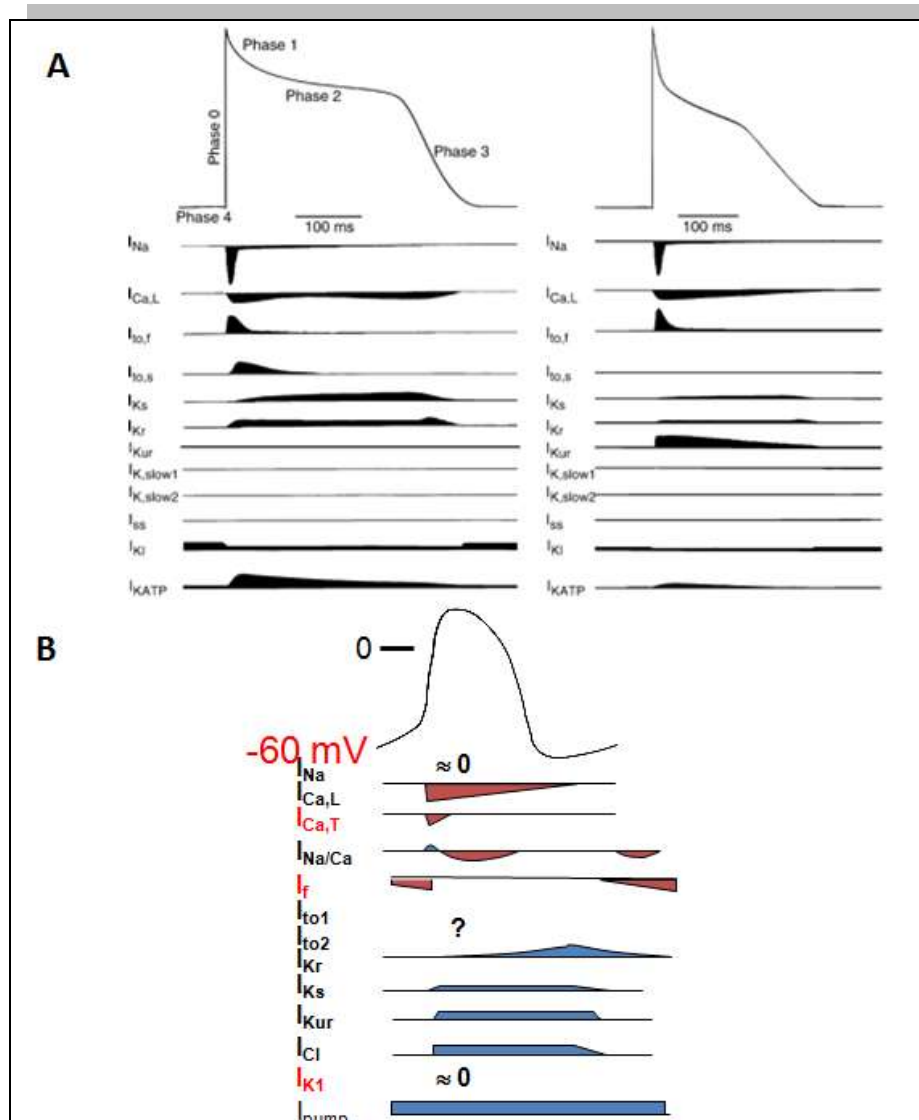


Figure 2: Potentiels d'action des myocytes cardiaques.

- A) PA ventriculaire (à gauche) et auriculaire (à droite) humains avec les différents courants ioniques impliqués dans les 5 phases. Le PA ventriculaire s'étend sur 350-400 ms et le PA auriculaire dure entre 200-250 ms. Le potentiel de repos auriculaire et ventriculaire est d'environ -80 mV (Nerbonne et Kass 2005).
- B) Le PA du nœud sinusal est automatique.

L'activité électrique totale du cœur, reflétant ces différences de PA est visualisée sur un tracé d'électrocardiogramme de surface (ECG).

2.1.3 Le rythme cardiaque, l'ECG

L'ECG est un enregistrement qui révèle à l'échelle de l'organisme, les différents phénomènes électriques associés aux battements du cœur. L'ECG donne une représentation graphique de l'activité cardiaque (Figure 3).

La contraction cardiaque résulte de la contraction, et donc de l'activation électrique, coordonnée des cardiomyocytes. Si les canaux ioniques ne fonctionnent pas correctement, l'activité électrique des cardiomyocytes devient anarchique et est à l'origine de troubles du rythme. Ces troubles peuvent être secondaires suite à un traitement médicamenteux, à des pathologies cardiaques (infarctus du myocarde, hypertrophie ventriculaire, développement de fibrose, par exemple) ou sont la conséquence de mutations sur des canaux ioniques ou sur des protéines partenaires de ces canaux. Ces troubles sont mis en évidence grâce aux ECGs. Par exemple un trouble de la conduction ventriculaire est caractérisé par un allongement du complexe QRS.

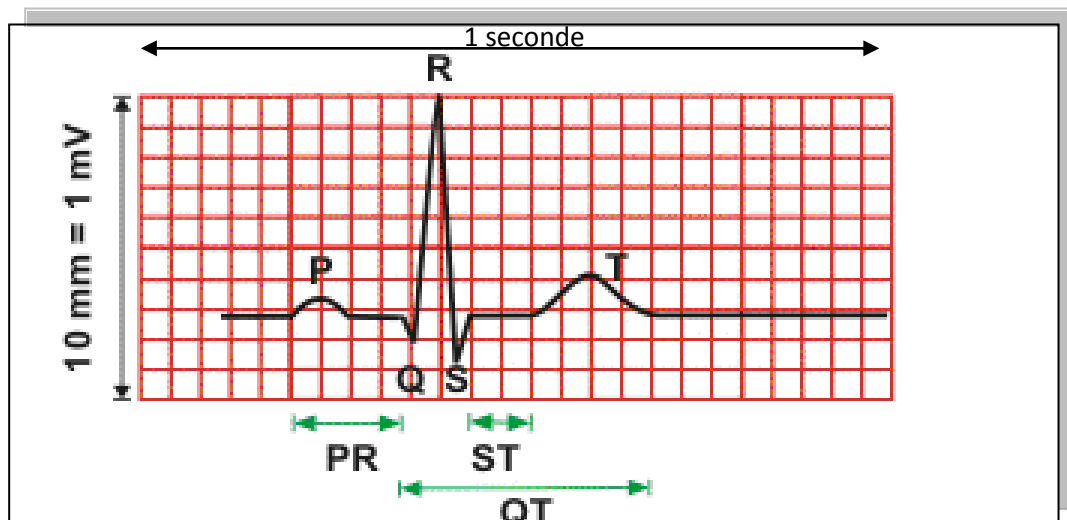


Figure 3 : Représentation de l'activité électrique du cœur au cours d'un battement donné par le tracé d'un ECG de surface.

L'onde P représente la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules et l'onde T à la repolarisation ventriculaire.

Ces troubles faisant suite aux dysfonctionnements des canaux ioniques sont appelés canalopathies. Le canal Nav1.5 est impliqué dans plusieurs canalopathies telles que le syndrome du QT long et le syndrome de Brugada.

2.2 Les canalopathies

2.2.1 Le syndrome du QT long, LQTS

Description du LQTS

Le syndrome du QT long, (Long QT Syndrome, LQTS) est défini comme un allongement de l'intervalle QT sur l'ECG, reflétant une repolarisation ventriculaire retardée. Cette repolarisation retardée peut provoquer des tachycardies polymorphes se traduisant par des syncopes et peut aussi conduire à des fibrillations ventriculaires, à l'origine des morts subites (Roden 1998; Roden 2008). Le LQTS se caractérise par un QTc (intervalle QT corrigé par la fréquence cardiaque) supérieur à 460 ms chez la femme et 440 ms chez l'homme (Roden 2008).

Le syndrome du QT long congénital a été décrit en premier par Jervell et Lange-Nielsen en 1957, à partir d'une famille de six enfants, dont quatre souffraient d'une surdité bilatérale et d'un allongement de leur intervalle QT sur leurs ECGs et trois avaient fait une mort subite. Ils ne présentaient aucune anomalie de structure au niveau du cœur, mais avaient des épisodes répétés de syncopes (Jervell et Lange-Nielsen, 1957). Le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen est associé avec une surdité bilatérale et est transmis selon un mode autosomique récessif (Jervell et Lange-Nielsen, 1957).

Le syndrome de Romano et Ward, décrit dans les années 1960, le plus fréquemment observé, est très assimilable à celui décrit quelques années plus tôt par Jervell et Lange Nielsen (Romano, 1965; Ward, 1964). Cependant ce syndrome se développe plus tardivement. Il est transmis selon un mode autosomique dominant et présente une pénétrance incomplète³ (Karhunen *et al.* 1970). Aucune surdité n'est associée au QT long.

Le LQTS peut être une conséquence d'un traitement médicamenteux ou d'un désordre structural du cœur, dans ce cas on parle de LQTS acquis.

Le LQTS congénital touche une personne sur 3000 à 5000 et les premiers symptômes apparaissent au cours des 20 premières années (Shah *et al.* 2005; Tfelt-Hansen *et al.* 2010). Actuellement les mutations décrites dans les LQTS sont répartis sur douze gènes (Tfelt-Hansen *et al.* 2010; Vohra 2007).

Un classement des LQTS, dénommés LQT1 à LQT13, a été établi en fonction du gène modifié (Tableau 2) ; trois gènes sont principalement responsables des LQTS congénitaux. Les

³ La pénétrance est incomplète c'est-à-dire que des individus de génotype identique n'exprimeront pas tous le même phénotype. Certains membres des familles portent la mutation mais ne développeront jamais de troubles cardiaques. Ils resteront asymptomatiques, alors que d'autres auront dès leur plus jeune âge des syncopes.

mutations de la protéine canal Kv7.1 (KCNQ1), plus de 300 connues à ce jour, sont responsables de 50 % des LQTS (Peroz *et al.* 2008). Le LQT2, dû à des mutations de Kv11.1 (Herg), est responsable de 30-40 % des cas et le LQT3, conséquent à des modifications de Nav1.5 est à l'origine de 5-10 % des cas (Shah *et al.* 2005).

Les mutations à l'origine de ces LQTS peuvent aussi avoir des conséquences sur le développement d'autres organes. Ainsi dans le syndrome rare d'Andersen, les patients souffrant de LQTS développent des faiblesses musculaires associées à des paralysies périodiques et ont des malformations (implantation basse des oreilles, syndyctalie des orteils, nez large...) (Sansone *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2005).

Une forme de LQTS aigue, a aussi été observée chez des jeunes⁴ patients souffrant également d'anomalies structurales du cœur (telle une malformation du septum, des hypertrophies...) d'autisme et de malformations (implantation basse des oreilles, nez aplati, syndyctalie de 2 ou 3 doigts...) dans le syndrome de Timothy (Crotti *et al.* 2008).

⁴ Les patients souffrant du syndrome de Timothy, ont une durée de vie de 2.5 ans

Tableau 2: Classification des syndromes des QT-longs congénitaux et les gènes associés.

	Locus	Gène	Protéine
Romano-Ward			
LQT1	11p15.5	KCNQ1	Kv7.1 (KvLQT1)
LQT2	7q35-q36	KCNH2	Kv11.1 (HERG)
LQT3	3p21-p23	SCN5A	Nav1.5
LQT4	4q25-q27	ANK2	Ankyrin B
LQT5	21q22	KCNE1	minK (IsK)
LQT6	21q22	KCNE2	mirp1
LQT9	3p25	CAV3	Caveolin
LQT10	11q23	SCN4B	Navβ4
LQT11	7q21-q22	AKAP9	A-Kinase Anchor Protein (Yotiao)
LQT12	20q11.2	SNTA1	1-α syntrophin
LQT13	17q21.2	PTRF-CAVIN	Polymerase I and transcript release factor/Cavin
Jervell & Lange-Nielsen (+surdité bilatérale)			
JLN1	11p15.5	KCNQ1	KvLQT1
JLN2	21q22	KCNE1	minK (IsK)
Andersen (+paralysie périodique des muscles squelettiques+malformations)			
LQT7	17q23.1-q34.2	KCNJ2	Kir2.1
Timothy (+syndactylie, hypoglycémie, autisme, malformations cardiaques...)			
LQT8	12p13.3	CACNA1C	Cav1.2

Le LQT3

Le LQT3 correspond au syndrome du QT long observé chez des patients ayant des mutations sur le gène *SCN5A* codant la protéine Nav1.5. Le LQT3 se développe plus tardivement que les LQTS dus aux défauts des canaux potassiques, mais semble plus fatal (Grant 2001; Zimmer et Surber 2008). Ainsi, les troubles cardiaques apparaissent à 11 et 13 ans chez les jeunes garçons souffrant de LQT1 et LQT2, respectivement, et à 16 ans pour le LQT3. Cet âge est plus élevé chez les jeunes filles (18, 16 et 23 ans respectivement) (Priori *et al.* 2003).

Pour le LQT3, les syncopes et les arrêts cardiaques ont en général lieu au repos, alors que pour les LQT1 et LQT2, ces événements font suite à un stress physique ou émotionnel (Grant 2001).

C'est en 1995 que la première mutation de Nav1.5 a été décrite dans un syndrome de QT long (Wang *et al.* 1995). Maintenant, 84 mutations de ce gène sont connues dans le LQTS. Ces mutations sont à l'origine d'un gain de fonction du canal sodique, (contrairement aux mutations des canaux potassiques qui provoquent des pertes de fonction) qui résulte d'un défaut de l'inactivation (Grant 2001). Les canaux sodiques sont normalement totalement inactivés au cours de la phase plateau et de la phase de repolarisation du PA cardiaque. Chez les patients souffrant de LQT3, les canaux Nav1.5 ne sont pas totalement inactivés et sont donc à l'origine d'un courant I_{Na} persistant au cours de ces deux phases. Ce faible courant sodique est à l'origine d'un déséquilibre des courants entrants et sortants au cours de la phase du plateau du PA cardiaque, provoquant un allongement de la phase plateau et de la repolarisation ce qui induit une prolongation du PA cardiaque (Figure 4) (Roden *et al.* 1996).

Ces mutations sont principalement des mutations faux sens et leur incidence est plus élevée dans les boucles S1-S2 et S3-S4 que dans les régions intracellulaires et transmembranaires. Ceci suggère que toutes ces régions sont importantes dans l'inactivation du canal au cours de la phase de repolarisation du PA cardiaque. En revanche aucune mutation, chez les patients souffrant de LQT3, n'a encore été identifiée dans la boucle P (reliant les segments S5 et S6), dans les segments S1 et dans les segments transmembranaires du domaine deux (Zimmer et Surber 2008).

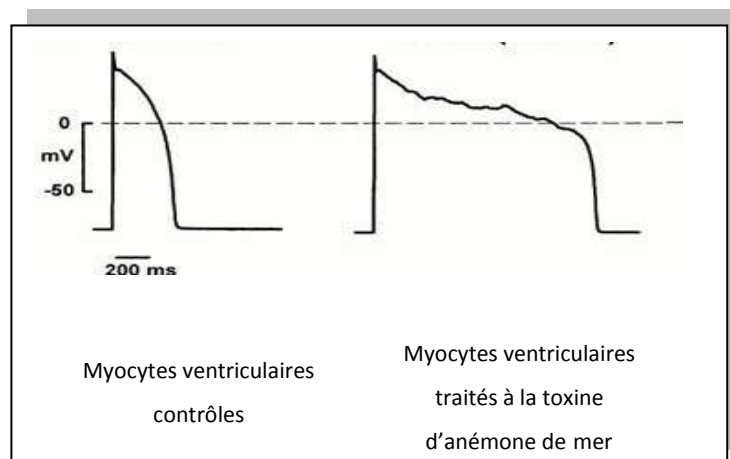


Figure 4 : Conséquences d'un retard d'inactivation du courant sodique sur le PA.

Le PA à droite a été enregistré à partir de myocytes ventriculaires de lapins traités avec la toxine de l'Anémone de mer, qui ralentit l'inactivation des canaux sodiques, mimant ainsi le PA obtenu chez un patient souffrant de LQT3. Nous observons bien un allongement de la phase du plateau du PA cardiaque dans les myocytes simulant un LQT3, comparé avec le PA des myocytes contrôles, à gauche (Studenik *et al.* 2001).

2.2.2 Le syndrome de Brugada, BrS

Description du BrS

Le syndrome de Brugada (BrS) a été défini en 1992 par les frères Brugada (P Brugada et J Brugada 1992). Il est caractérisé par une élévation du segment ST et d'une inversion de l'onde T sur au moins deux dérivations précordiales droites (V1-V3) enregistrées sur un cœur structurellement sain, traité ou non avec des agents bloquant le canal sodique. Trois types de BrS sont définis (Figure 5) (Antzelevitch *et al.* 2005):

- Le BrS de type I se caractérise par une élévation convexe du segment ST de plus de 0,2 mV, suivie par une onde T inversée.
- Le BrS de type II, se caractérise par une élévation concave, dite en « selle de cheval », du segment ST de plus de 0,2 mV et dont la partie terminale est supérieure à 0,1 mV. L'onde T qui suit est positive ou biphasique.
- Le BrS de type III, se caractérise par une élévation concave ou convexe du segment ST avec une portion terminale inférieure à 0,1 mV, l'onde T est biphasique ou positive.

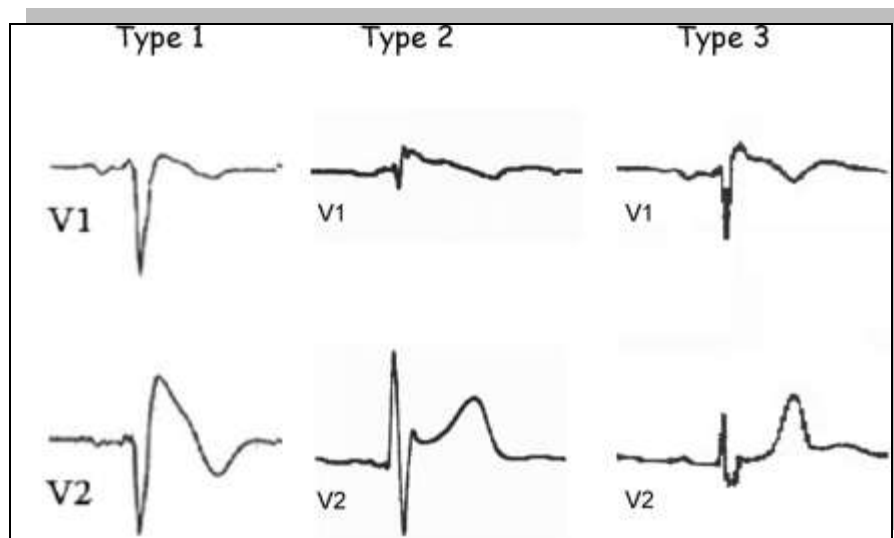


Figure 5 : Représentation des ECGs des 3 types de syndrome Brugada. (Probst *et al.* 2010)

Chez les individus présentant au moins sur deux dérivations, de V1 à V3, un ECG de type II ou III, le diagnostic du BrS doit être confirmé par un traitement avec un antiarythmique bloqueur des canaux sodiques (comme l'ajmaline ou la flécaïnide). Si, suite à ce traitement, un ECG de type I se révèle (avec une élévation du segment ST supérieure à 0,2 mV), le BrS est

confirmé. Pour confirmer un diagnostic de BrS, le tableau clinique des patients doit donc comporter un ECG de type I (avec ou sans traitement pharmacologique) associé à des fibrillations ventriculaires ou des tachycardies ventriculaires polymorphes ou encore à des antécédents familiaux de morts subites (Antzelevitch *et al.* 2005).

Les premiers symptômes apparaissent en moyenne vers l'âge de 40 ans⁵ et touchent principalement les hommes⁶ (Priori *et al.* 2002). Les syncopes ou les arythmies associées surviennent préférentiellement au repos ou au cours du sommeil et peuvent conduire à des morts subites (Tfelt-Hansen *et al.* 2010). Cette maladie a une incidence de 5 pour 10000 et est plus particulièrement présente en Asie du Sud (Herbert et Chahine 2006; Nademanee *et al.* 1997). Elle serait responsable de plus de 4 % des morts subites et de 20 % des morts subites sur un cœur structurellement sain (Antzelevitch *et al.* 2005).

La normalité structurale du cœur est l'élément clé pour la pose du diagnostic du BrS (Brugada et Brugada 1992). Toutefois, cette intégrité structurale est remise en question. De plus en plus de BrS sont en effet associés avec des remodelages du cœur tels que des fibroses interstitielles ou des myocardites (Coronel *et al.* 2005; Frustaci *et al.* 2005).

L'hétérogénéité entre les PA des cardiomyocytes du myocarde sous-épicaudique et du myocarde sous-endocardique au cours de la phase précoce de repolarisation du PA cardiaque (phase 1) est à l'origine des arythmies liées au BrS. En effet, le courant sortant potassique majoritaire dans cette phase (I_{to}) est plus important dans les myocytes du myocarde sous-épicaudique que dans ceux du myocarde sous-endocardique. Il est, de plus, plus grand dans le ventricule droit que dans le ventricule gauche. Aussi, une réduction du courant sodique dans cette phase entraîne-t-elle une plus grande prolongation du PA dans les myocytes du myocarde sous-épicaudique du ventricule. Cela accentue l'hétérogénéité des PA entre le myocarde sous-épicaudique et le myocarde sous-endocardique qui peut être le foyer d'arythmies qui dégénèrent en fibrillations ventriculaires (Figure 6) (Grant 2001). Une deuxième théorie se basant sur un modèle de dépolarisation, a été mise en place pour expliquer le syndrome de Brugada. Cette théorie considère un retard de conduction dans la région de la voie efférente de la paroi libre du ventricule droit épicaudique. Les deux théories sont cohérentes et se complètent. Comme pour de nombreuses autres maladies, il n'existe probablement pas qu'un seul mécanisme (Meregalli *et al.* 2005).

⁵ Le plus jeune patient atteint de BrS avait 2 jours et le plus âgé 84 ans (Antzelevitch *et al.* 2005).

⁶ 8 hommes développent le BrS pour 1 femme.

Les arythmies surviennent d'autant plus facilement que le rythme cardiaque est lent car I_{to} augmente quand la fréquence cardiaque diminue, d'où la prépondérance des accidents cardiaques pendant les phases de sommeil et de repos. Ainsi, toute mutation dans les différents canaux participant à la phase 1 du PA pourrait être à l'origine de cette élévation du segment ST et du BrS. Notamment un gain de fonction des canaux potassiques Kv4.3 responsables du courant I_{to} , ou une perte de fonction des canaux calciques ou sodiques. Actuellement, ce sont majoritairement des pertes de fonction de Nav1.5 qui sont répertoriées pour ce syndrome. Aucune mutation gain de fonction de Kv4.3 n'a encore été observée chez des patients souffrant de BrS.

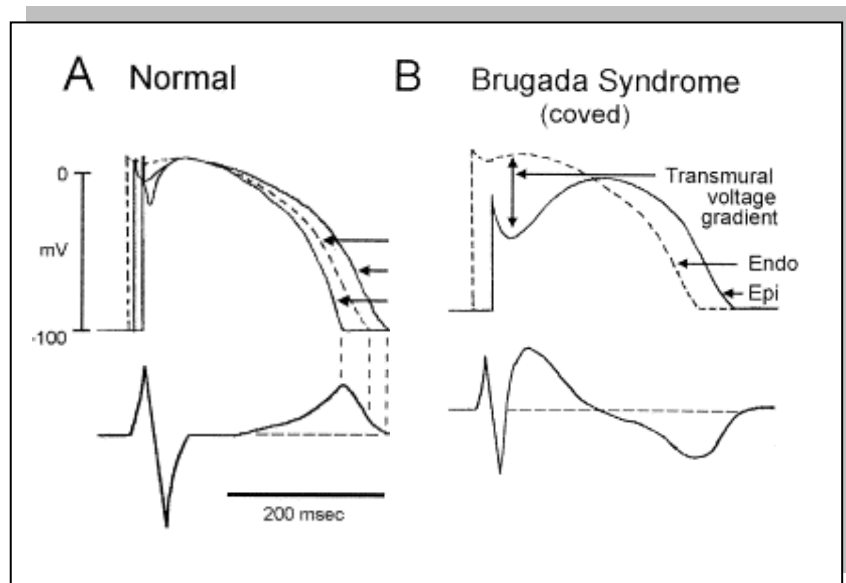


Figure 6 : repolarisation prématurée des myocytes ventriculaires du myocarde sous-épicaudique.

- A) Dans les conditions physiologiques, le segment ST est isoélectrique au niveau de la phase plateau du PA cardiaque.
- B) Dans le cas du BrS, une repolarisation plus précoce, accompagnée d'une prolongation du PA des myocytes du myocarde sous-épicaudique ont lieu, créant un gradient de potentiel transmurale à l'origine de l'élévation du segment ST et de l'inversion de l'onde T (**Antzelevitch 2006**).

En 1998, l'équipe de Chen reliait pour la première fois cette élévation du segment ST à des mutations du canal Nav1.5 (Chen *et al.* 1998). Depuis, 200 mutations de ce gène ont été identifiées comme étant responsable de 15 % des BrS (Tfelt-Hansen *et al.* 2010) et cinq autres gènes ont été impliqués.

Le canal calcique voltage-dépendant, composé de la sous-unité α , Cav1.2 et de la sous-unité régulatrice β , Cav β 2b, a été trouvé sous-exprimé dans une famille souffrant de BrS. Les

gènes codants pour ces deux sous-unités, CACNA1C et CACNB2 respectivement, peuvent être mutés et provoquer une perte de fonction du canal c'est-à-dire une diminution du courant calcique (Antzelevitch *et al.* 2007). Le gène KCNE3, dont la protéine est connue pour réguler négativement l'amplitude du courant généré par le canal potassique voltage-dépendant Kv4.3, I_{to} , est muté dans certains cas de BrS provoquant une augmentation du courant I_{to} . Il s'agit de l'unique gène connu à ce jour pour conduire à un gain de fonction de I_{to} dans BrS (Delpón *et al.* 2008; Tfelt-Hansen *et al.* 2010). Des mutations des protéines régulatrices de Nav1.5 ont aussi été récemment recensées. Ainsi, une mutation du gène de GPD1-L (Glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1-like), a été observée dans une famille italienne. La mutation de cette protéine conduit à un défaut d'adressage de Nav1.5 à la membrane, par un mécanisme dépendant d'une phosphorylation qui reste encore à définir (London *et al.* 2007; Valdivia *et al.* 2009; Weiss *et al.* 2002). De même, trois mutations dans le gène de Nav β 1, *SCN1B*, ont aussi été impliquées dans un défaut de trafic de Nav1.5 chez des patients souffrant de BrS (Watanabe *et al.* 2008). Encore plus récemment, une mutation dans un autre gène codant une protéine régulatrice de Nav1.5 a été identifiée, *SCN3B* (codant pour la protéine Nav β 3). Cette mutation est aussi à l'origine d'une perte du trafic de Nav1.5 à la membrane (la mutation semble être localisée proche du site d'interaction avec Nav1.5) et modifie les propriétés biophysiques de Nav1.5, conduisant à une perte de fonction du canal (Hu *et al.* 2009).

A ce jour, 30 % des BrS peuvent être expliqués génétiquement (Tfelt-Hansen *et al.* 2010). Les 70 % de cas restants sont encore inexpliqués, ils sont probablement dus à d'autres facteurs génétiques non encore identifiés. Les syndromes de Brugada congénitaux identifiés à ce jour présentent tous une pénétrance incomplète avec une incidence majoritaire chez l'homme.

Le canal Nav1.5 dans le syndrome de Brugada

Les mutations de Nav1.5 liées au BrS déterminent toutes une « perte de fonction » du canal. Ces mutations peuvent conduire à une diminution de la densité de canaux à la membrane (la mutation conduit à une protéine tronquée qui ne peut être insérée à la membrane ou à un défaut de trafic des canaux correctement synthétisés) ou encore à un déplacement de l'inactivation à l'état d'équilibre vers des potentiels plus négatifs (Tfelt-Hansen *et al.* 2010).

Une étude de Meregalli *et al.* classe les mutations de Nav1.5 en deux grandes catégories : les protéines mutées issues de l'insertion d'un « codon stop » formant des protéines tronquées (Nav1.5_T) et les protéines issues de mutations qui donnent des canaux sodiques fonctionnels (Nav1.5_{actifs}) ou non (Nav1.5_{inactifs}). Ils mettent en évidence que les patients avec des protéines

Nav1.5_T et Nav1.5_{inactifs} développant une forme de BrS plus sévère sont plus exposés à une mort subite. Cette étude suggère qu'une analyse génétique des patients à risque pourrait aider à déterminer la sévérité de la maladie (Meregalli *et al.* 2009; Tfelt-Hansen *et al.* 2010). La fièvre pourrait aussi être un indicateur du développement du BrS. Une élévation de la température semble perturber le fonctionnement des canaux sodiques. Par ailleurs il a été observé que la fièvre provoque une élévation du segment ST (Amin *et al.* 2008).

Les mutations du canal Nav1.5 dans le BrS sont réparties sur toute la protéine c'est-à-dire aussi bien dans les segments intracellulaires, extracellulaires mais aussi transmembranaires. Les mutations sont majoritaires au niveau de la boucle P. Les mutations au niveau du pore de Nav1.5 créent donc préférentiellement une perte de fonction qui est à l'origine du BrS. Les mutations faux sens dans les régions intracellulaires sont plus facilement tolérées (Zimmer et Surber 2008). Les mutations de Nav1.5 dans le BrS amènent à une diminution du courant sodique qui conduit, à un raccourcissement de la phase 1 du PA cardiaque. Le courant sodique, I_{Na} , est rapidement inactivé.

2.2.3 Les troubles progressifs de la conduction cardiaque

Les troubles de la conduction se développent en général suite à une cardiopathie, à une atteinte valvulaire, ou encore suite à une chirurgie cardiaque ou plus rarement à une inflammation. Ces troubles peuvent aussi être dégénératifs, il s'agit des troubles progressifs de la conduction cardiaque dont la plus importante est la maladie de Lenègre.

Cette maladie se caractérise par une altération progressive de la conduction cardiaque à travers les faisceaux de His et les fibres de Purkinje avec un « bloc de conduction » dans la branche droite ou gauche et par un allongement du complexe QRS. Ceci conduit à un « bloc » auriculo-ventriculaire complet à l'origine d'épisodes de syncopes et de morts subites. Ces troubles apparaissent avec l'âge et sont associés au développement d'une fibrose autour du système de conduction (Amin *et al.* 2010; Tfelt-Hansen *et al.* 2010; Zimmer et Surber 2008).

En 1999, Jean Jacques Schott décrivait pour la première fois un trouble de la conduction progressif congénital. L'étude portant sur une famille française de plus de 150 membres a permis de mettre en évidence l'implication du canal Nav1.5 dans le développement de troubles de la conduction progressifs familiaux (Probst *et al.* 2003; Schott *et al.* 1999). Depuis, onze mutations de Nav1.5 ont été attribuées à des troubles de la conduction congénitaux ou progressifs. Ces onze mutations amènent à une perte de fonction du canal, mais aucune de celles-ci n'a été associée à un syndrome de Brugada (Zimmer et Surber 2008).

Par ailleurs, depuis quelques années, des mutations de Nav1.5 ont été décrites communes aux trois syndromes, c'est-à-dire qu'au sein d'une même famille voire d'un même patient, la mutation est à l'origine du LQT3, du BrS et de la maladie de Lenègre, on parle alors de « syndrome overlap » (Tfelt-Hansen *et al.* 2010).

2.2.4 Le « syndrome chevauchant »

En 1999, l'équipe de Bezzina observait un allongement du segment QT concomitant à une élévation du segment ST chez un patient présentant une mutation en C-terminale de Nav1.5. L'insertion d'un acide aspartique en position 1795 du polypeptide (1795 insD), conduit au développement simultané des syndromes de Brugada et du QT long (Bezzina *et al.* 1999). Depuis, plusieurs études ont montré que le traitement du LQT3 à la flécaïnide pouvait conduire à l'apparition du syndrome de Brugada chez certains patients (Beinart *et al.* 2009; Priori *et al.* 2000). La flécaïnide est un agent bloquant des canaux sodiques, ainsi certains patients souffrant de LQT3 traités avec cette molécule, développent un BrS. La diminution du courant sodique induite par le traitement à la flécaïnide augmente les différences de PA entre les myocytes du myocarde sous endocardique et ceux du myocarde sous épicaudique pouvant induire de nouvelles arythmies (Makita *et al.* 2008). Dans le syndrome chevauchant induit par des agents bloquants du canal sodique, les ondes QT sont raccourcies et les élévations des segments ST sont exacerbées, favorisant le développement de nouvelles arythmies. Certaines mutations du canal Nav1.5 rendent le canal Nav1.5 plus sensible à la flécaïnide, ainsi les patients atteints de LQT3 traités à la flécaïnide ne développent pas tous de BrS (Makita *et al.* 2008).

De façon surprenante, dans une famille un patient était traité avec un défibrillateur cardiaque pour le BrS et un autre avec un pacemaker car il développait des troubles sévères de la conduction (Kyndt *et al.* 2001). L'étude de la famille, menée dans notre laboratoire a regroupé 70 personnes et a permis de mettre en évidence une mutation faux sens dominante, remplaçant l'arginine en position 1406 en glycine, G1406R, identifiée dans le gène de Nav1.5, (Kyndt *et al.* 2001). En fait, quatre hommes portant la mutation avaient un ECG caractéristique d'un syndrome de Brugada et sept autres membres de la famille, six femmes et un homme, étaient aussi porteurs de la même mutation mais développaient des troubles de la conduction. Seule la mutation située entre les segments S5-S6 du domaine DIII était exprimée chez ces patients et pouvait être responsable de leur phénotype. Cette mutation provoque une perte de fonction totale du canal, mais n'empêche pas son trafic à la membrane. Le sexe des individus et d'autres facteurs environnementaux jouent probablement un rôle majeur dans le développement des phénotypes (Kyndt *et al.* 2001).

De façon encore plus originale, une mutation dans la boucle intracytoplasmique des domaines DIII et DIV, dans la région d'inactivation, à cinq acides aminés du motif KPQ, en position 1505 (dont la délétion, Δ KPQ, est connue dans le LQT3) a été décrite pour provoquer à la fois un QT long, un BrS mais aussi des troubles de la conduction (Grant *et al.* 2002). Encore récemment, une étude sur la mutation Δ KPQ, suggère le développement de troubles de la conduction chez les souris vieillissant avec la mutation (Guzadhur *et al.* 2010).

L'ensemble de ces travaux suggère l'existence d'une maladie « unique » due à Nav1.5 dérivant vers un LQT3 ou un BrS ou encore vers des troubles de la conduction, en fonction de l'environnement (Rivolta *et al.* 2001). Cette maladie serait à l'origine de syncopes et d'arrêts cardiaques à haut risque de mortalité et ces événements auraient principalement lieu au repos et au cours du sommeil, mais son étiologie reste à définir.

L'implication du canal Nav1.5 dans les cardiomyopathies est aujourd'hui bien établie. Toutefois sa participation dans les différents syndromes n'est pas encore bien comprise et les seuls moyens de palier des effets, dans le LQT3 et le BrS, restent l'implantation de défibrillateurs cardiaques dans le cas de BrS ou de stimulateurs cardiaques dans les cas de LQT3 et de troubles de la conduction. En effet, comme je l'ai mentionné plus haut, le traitement du QT long par des inhibiteurs du courant sodique peut renverser le phénotype vers le développement d'un BrS. Afin de mieux comprendre le rôle de Nav1.5 dans ces pathologies, différents modèles de souris développant ces syndromes ont été créés dans plusieurs laboratoires.

3. Les modèles de souris

La description des canaux a été majoritairement faite à partir de systèmes d'expression hétérologues. Depuis le début des années 2000, des modèles de souris transgéniques pour le canal Nav1.5 ont été créés, bien que de grandes différences électrophysiologiques existent entre l'Homme et la souris. Néanmoins, ces modèles permettent de confirmer ou d'infirmer les observations des systèmes d'expression hétérologues et constituent de bons outils pour mieux comprendre le canal dans son environnement. La revue que nous avons publiée en 2008, répertorie les différents modèles de souris transgéniques pour le canal Nav1.5.

En 2001, l'équipe de Nuyens a généré un modèle de souris hétérozygotes pour la délétion Δ KPQ 1505-1507, reprise en 2005 par Head *et al* (Head *et al.* 2005; Nuyens *et al.* 2001). Cette mutation est principalement responsable de LQT3 chez l'Homme (Wang *et al.* 1995). Ces souris transgéniques développent comme l'Homme, un QT long et ont permis de confirmer que les arythmies observées chez ces souris pourraient résulter de réentrées provoquées par des dépolarisations précoces. Des études pharmacologiques sur ces souris ont aussi permis de montrer que les bloqueurs des canaux sodiques peuvent prévenir les morts subites dans le cas des LQT3, en revanche les β -bloquants sont à proscrire (Head *et al.* 2005; Stokoe *et al.* 2007).

En 2004, un autre modèle de souris transgéniques développant un LQT3 a été établi. Ces souris transgéniques expriment le gène *SCN5A* humain avec la mutation N1325S (Tian *et al.* 2004). Ce gène a été placé sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de l' α -myosine assurant ainsi une expression spécifiquement cardiaque. Ce modèle explique l'alternance d'ondes T au cours de tachycardies sinusales, en montrant une dérégulation du calcium intracellulaire au cours de ce phénomène (Tian *et al.* 2004; Yong *et al.* 2007).

Un modèle de souris dont le gène *Scn5a* a été invalidé, souris « knockout », KO, a été élaboré par Papadatos en 2002 (Papadatos *et al.* 2002). Les souris KO homozygotes, ne sont pas viables. En revanche les souris hétérozygotes dont un seul allèle est invalidé survivent (Papadatos *et al.* 2002). Cependant ces souris développent avec l'âge des troubles de la conduction de plus en plus marqués accompagnés d'une fibrose ventriculaire (Leoni *et al.* 2010; Royer *et al.* 2005). Ces souris *Scn5a*^{+/-}, représentent un très bon modèle d'étude pour le syndrome de Brugada et pour les troubles progressifs de la conduction cardiaque, comme la maladie de Lenègre.

Un dernier modèle de souris présente « l'overlap syndrome ». Ces souris sont hétérozygotes pour la mutation *Scn5a*^{1798insD/+}, les souris homozygotes n'étant pas viables (Remme *et al.* 2006). Cette mutation correspond à celle responsable chez l'Homme de LQT3, de

bradycardies, de syndrome de Brugada et de troubles de la conduction (Bezzina *et al.* 1999). Cette unique mutation provoque chez les souris les mêmes perturbations que chez l'Homme (Remme *et al.* 2006). Ainsi une seule mutation de Nav1.5 suffit à engendrer un « overlap syndrome ».

Un modèle de souris KO pour la sous-unité régulatrice $\beta 1$ a aussi récemment été créé. Ces souris développent un QT long sans aucun autre défaut de conduction (Lopez-Santiago *et al.* 2007).

En conclusion, les souris transgéniques sont de très bons outils pour mieux comprendre la régulation du canal Nav1.5 qui reste encore bien obscure. En effet, de nombreuses protéines partenaires de Nav1.5 ont été décrites, mais pour l'heure nous ne savons pas exactement comment ces protéines régulent Nav1.5.

Ainsi au cours de ma thèse, j'ai étudié les protéines partenaires de Nav1.5 dans les cardiomyocytes.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Biophysics and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pbiomolbio

Review

Mouse models of *SCN5A*-related cardiac arrhythmiasFlavien Charpentier^{a,b,c,d,*}, Anne Bourgé^{a,b,c}, Jean Mérot^{a,b,c}^aINSERM, UMR915, Institut du Thorax, F-44000 Nantes, France^bCNRS, ERL3147, Cardiopathies et Mort Soudaine, F-44000 Nantes, France^cUniversité de Nantes, F-44000 Nantes, France^dCHU Nantes, Institut du Thorax, F-44000 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 12 November 2008

Keywords:

SCN5A
Arrhythmia
Channelopathy
Transgenic mouse

ABSTRACT

Both gain- and loss-of-function mutations in the *SCN5A* gene, which encodes the α -subunit of the cardiac voltage-gated Na^+ channel $\text{Na}_v1.5$, are well established to underlie hereditary arrhythmic syndromes (cardiac channelopathies) such as the type 3 long QT syndrome, cardiac conduction diseases, Brugada syndrome, sick sinus syndrome, atrial standstill and numerous overlap syndromes. Although patch-clamp studies in heterologous expression systems have provided important information to understand the genotype–phenotype relationships of these diseases, they could not clarify how mutations can be responsible for such a large spectrum of diseases, the late age of onset or the progressiveness of some of them, and for the overlapping syndromes. Genetically modified mice rapidly appeared as promising tools for understanding the pathophysiological sequence of cardiac *SCN5A*-related channelopathies and several mouse models have been established. Here, we review the results obtained on these models that, for most of them, convincingly recapitulate the clinical phenotypes of the patients but that also have their own limitations. Mouse models turn out to be powerful tools to elucidate the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related diseases and offer the opportunity to investigate the cellular consequences of *SCN5A* mutations such as the remodelling of other gene expression that might participate in the overall phenotype and explain some of the differences among patients. Finally, they also constitute useful tools for future studies addressing as yet unanswered questions, such as the role of genetic and environmental modifiers on cardiac conduction and repolarisation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	230
2. <i>SCN5A</i> -Δ1505–1507KPKQ knock-in mouse: An LQT3 model	231
3. h <i>SCN5A</i> -N1325S transgenic mouse model: An LQT3 model	233
4. <i>Scn5a</i> knockout mouse model: A Brugada and PCCD model	234
5. <i>Scn5a</i> -1798insD knock-in mouse model: An overlap syndrome model	234
6. <i>Scn1b</i> knockout mouse: A scheming model	235
7. Conclusion	235
Acknowledgements	235
References	235

1. Introduction

Mutations in the *SCN5A* gene, which encodes the α -subunit of the cardiac voltage-gated Na^+ channel $\text{Na}_v1.5$, are well established to underlie hereditary arrhythmic syndromes (so-called cardiac channelopathies). On one hand, gain-of-function mutations, which increase the late component of I_{Na} and thus prolong the ventricular

* Corresponding author, INSERM UMR915, CNRS ERL3147, Institut du Thorax, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex, France. Tel.: +33 2 40 41 28 44; fax: +33 2 40 41 29 50.
E-mail address: flavien.charpentier@nantes.inserm.fr (F. Charpentier).

action potential, are responsible for the type 3 long QT syndrome (LQT3; Moss and Kass, 2005). On the other hand, loss-of-function mutations decrease the Na^+ current (I_{Na}) and are responsible for cardiac conduction diseases, either progressive (Schott et al., 1999; Probst et al., 2003) or not (Tan et al., 2001). Brugada syndrome (Gussak et al., 1999), sick sinus syndrome (Benson et al., 2003) and atrial standstill (Groenewegen et al., 2003). To complicate matters further there also seems to be an association between *SCN5A* genetic defects and susceptibility to dilated cardiomyopathy (McNair et al., 2004) and atrial fibrillation (Laitinen-Forsblom et al., 2006; Ellinor et al., 2008).

Although patch-clamp studies in heterologous expression systems have provided a great deal of information to understand the genotype–phenotype relationships of these diseases, these oversimplified models could not clarify how loss-of-function-mutations can be responsible for such a large spectrum of diseases, the late age of onset or the progressiveness of some of them. In fact, the well established genotype–phenotype relationships defined for *SCN5A* mutations now need to be re-challenged since the original observation that within the same family, a single *SCN5A* mutation could result in either LQT3 syndrome, conduction disorders or Brugada syndrome (Bezzina et al., 1999). Indeed, many overlap syndromes have now been described (for recent review, see Remme et al., 2008).

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

2. *SCN5A*- Δ 1505–1507KPQ knock-in mouse: An LQT3 model

The LQT3 syndrome, originally linked to *SCN5A* gene in 1995 (Wang et al., 1995) is often more lethal, although less frequent, than LQT1 and LQT2 (Priori et al., 2003). Like in other LQT syndromes, the abnormal prolongation of ventricular repolarisation, reflected on the surface ECG by a long QT interval, is associated with a susceptibility to a specific ventricular tachycardia called *torsades de pointes* and ventricular fibrillation, from which syncope and sudden death often precipitate. Clinically, LQT3 is characterised by unusually increased duration of the ST segment with a late appearance of the T wave (Moss, 2002). Bradycardia and pauses occurring at rest or more particularly during sleep are often at the origin of the arrhythmias. However, fatal tachycardia-induced arrhythmias have also been reported for a third of the

patients (Schwartz et al., 2001). Most of the *SCN5A* mutations found in LQT3 alter the fast inactivation process of the channel. For example, the first identified *SCN5A* mutation that leads to the deletion of three amino acids (1505–KPQ–1507) in the inactivation domain of $\text{Na}_v1.5$ (Fig. 1) results in a persistent inward Na^+ current (Wang et al., 1996). This persistent inward depolarising current during the action potential plateau phase (Moss and Kass, 2005) delays the repolarisation of the action potential and leads to long QT.

In 2001, Nuyens et al. generated a knock-in mouse model lacking the same KPQ residues. Mice heterozygous for this mutation (*Scn5a*^{Δ1/1}) showed typical features of the LQT3 syndrome (Fig. 2) and spontaneously developed ventricular arrhythmias. Compared with wild-type mice, transmembrane action potentials recorded in ventricular preparations were markedly prolonged in *Scn5a*^{Δ1/1} mice (Fig. 3A) and showed a steeper “heart rate” vs. “action potential duration” relationship (Fig. 3B) (Nuyens et al., 2001). Action potential amplitude and upstroke velocity were not altered. Whole-cell patch-clamp recordings performed on cardiomyocytes confirmed the mutation-dependent increase in late inward Na^+ current previously observed in heterologous expression system, which explains the action potential prolongation (Wang et al., 1996). More surprising was a two-fold increase in the initial fast (peak) Na^+ current density, which could not be explained by an overexpression of $\text{Na}_v1.5$ or changes in the steady-state activation and inactivation of the current. However, this puzzling finding was not confirmed in a more recent study (Fredj et al., 2006) and the reason for this discrepancy remains to be clarified. Nuyens and co-workers' study (Nuyens et al., 2001) also revealed an acceleration of the recovery from inactivation, a property that might favour re-entrant arrhythmias. Indeed, intracardiac pacing with extrastimuli, short-long-short pacing sequences and abrupt accelerations of heart rate reproducibly induced polymorphic ventricular arrhythmias in *Scn5a*^{Δ1/1} mice but not in wild-type mice (Fig. 3C). The *Scn5a*^{Δ1/1} mice were also characterised by a paradoxical transient action potential prolongation upon abrupt acceleration of pacing rate that favoured the occurrence of early afterdepolarisations (Fig. 3A). This phenomenon, which was prevented by the Na^+ channel blocker mexiletine and the adrenergic agonist isoproterenol, can be explained by the increase of both fast and slow components of the Na^+ current which causes a sudden increase of Na^+ load, and secondarily of Ca^{2+} load. Thus, during each action potential, the increased Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum activates a larger Na/Ca exchanger current that favours the occurrence of early afterdepolarisations.

Altogether, these animals recapitulate most of the LQT3 associated clinical symptoms and enabled unveiling of the cellular mechanisms of tachycardia-induced arrhythmias. Furthermore, the fact that ventricular preparations of *Scn5a*^{Δ1/1} mice, and not wild-type preparations, also spontaneously developed early

Table 1
Mouse models of cardiac Na^+ channelopathies circa 2008.

Mouse	Genetic modification	Strain	ECG phenotype	Arrhythmias	Effect on Na^+ current	Human disease	Original reference
<i>Scn5a</i> ^{Δ1/1}	KI/heterozygote/ 1505KPQ1507 del.	NR ^a 129/Sv	QT prolongation	Spontaneous VT EADs in vitro	increased late current	LQT3	Nuyens et al., 2001; Head et al., 2005
<i>hSCN5A</i> -N13255	Tg/point mutation	NR	QT prolongation	Spontaneous VT EADs in vitro	delayed inactivation, increased late current	LQT3	Tan et al., 2004
<i>Scn5a</i> ^{+/−}	KO/heterozygote	129/Sv	P wave, PR and QRS prolongation	Triggered VT	≈ 50% decrease in peak current	Brugada, PCCD	Papadatos et al., 2002
<i>Scn5a</i> ^{1988del/1}	KI/heterozygote/ insertion	FVB/N	PR, QRS and QT prolongation	Sinus pauses EADs in vitro	≈ 40% decrease in peak current; increased late current	Overlap syndrome (LQT3–Brugada–CCD)	Remme et al., 2006
<i>Scn7b</i> KO	KO/homozygote	C57BL/6	RR and QT prolongation	ND	1.6 fold increase in peak and late current	?	Lopez-Santiago et al., 2007

Abbreviations: del, deletion; EAD, early afterdepolarisation; KI, knock-in; KO, knockout; LQT3, type 3 long QT syndrome; ND, not determined; NR, not reported; PCCD, progressive cardiac conduction defects; VT, ventricular tachycardia; Tg, transgenic.

^a Applies to Nuyens et al., 2001.

Author's personal copy

232

F. Charpentier et al. / Progress in Biophysics and Molecular Biology 98 (2008) 230–237

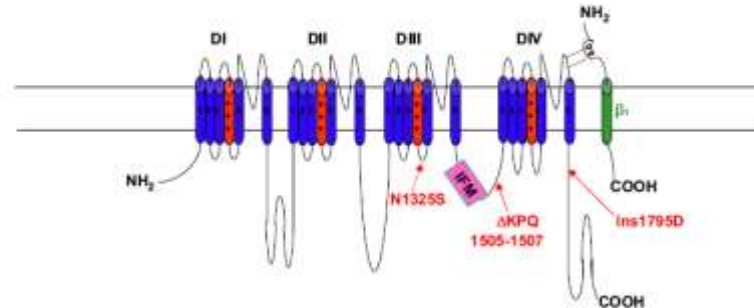


Fig. 1. Schematic representation of Na_v1.5 and its associated β₁-subunit. The four homologous domains of Na_v1.5 are indicated by DI–DIV. The fourth transmembrane segments, which form the voltage sensors, are represented in red. The IFM (Isoleucine–Phenylalanine–Methionine) domain, which is supposed to play a part in the fast inactivation gating, is illustrated in pink. Mutations discussed in the review are localised by red arrows.

afterdepolarisations at low pacing rates suggests that similar process/pathways initiate bradycardia-induced arrhythmias.

More recently, a similar *Scn5a*^{ΔKPQ} mouse line, exhibiting the same phenotype as the previous line, was created and submitted to an extended pharmacological analysis (Head et al., 2005). Electrophysiological studies performed on Langendorff-perfused whole hearts confirmed the anti-arrhythmic properties of mexiletine (Fabritz et al., 2003; Head et al., 2005) and showed that another Na⁺ channel inhibitor (flecainide) could also prevent arrhythmias (Stokoe et al., 2007) whereas β-blockers were inefficient (Head et al., 2005). More recently, they showed that specific inhibition of the L-type Ca²⁺ channels with nifedipine was also efficient in preventing ventricular arrhythmias through suppression of early afterdepolarisations (Thomas et al., 2007). These studies also confirmed the key role played by bradycardia and increased dispersion of repolarisation on the occurrence of spontaneous ventricular arrhythmias (Fabritz et al.,

2003). Sudden rate accelerations initially and transiently increased the dispersion of repolarisation due to early afterdepolarisations and action potential alternans (Fabritz et al., 2003), a result consistent with previous *in vivo* data (Nuyens et al., 2001), and then secondarily suppressed and prevented ventricular tachycardia by decreasing dispersion of repolarisation and suppressing early afterdepolarisations. Arrhythmogenesis, as assessed by programmed electrical stimulation on Langendorff-perfused hearts, has also been associated with abnormal patterns of myocardial activation and abnormal transmural gradient of repolarisation (Stokoe et al., 2007), which may support re-entrant events following premature excitation. More recently, however, Sabir et al. (2008) proposed that the increases of the slopes of restitution curves (plotting action potential duration against the preceding diastolic interval; Gilmour, 2003) to values greater than 1, rather than increased dispersion of repolarisation, was associated with arrhythmogenicity.

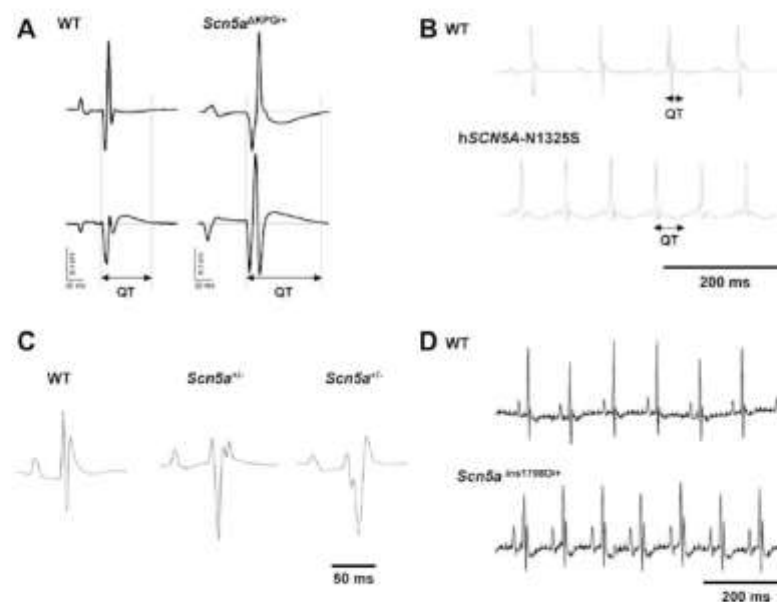


Fig. 2. Representative ECG recordings. (A) ECG of wild-type and *Scn5a*^{ΔKPQ} mice (adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Medicine 7, 1021–1027, 2001.) (B) ECG of *hScn5A-N1325S* mice (adapted by permission from Oxford University Press: Cardiovascular Research 61(2), 256–267, 2004.) (C) ECG of *Scn5a*^{-/-} mice (adapted by permission from Royer et al., 2005.) (D) ECG of *Scn5a*^{Ins1795D/+} mice (adapted by permission from Remme et al., 2006).

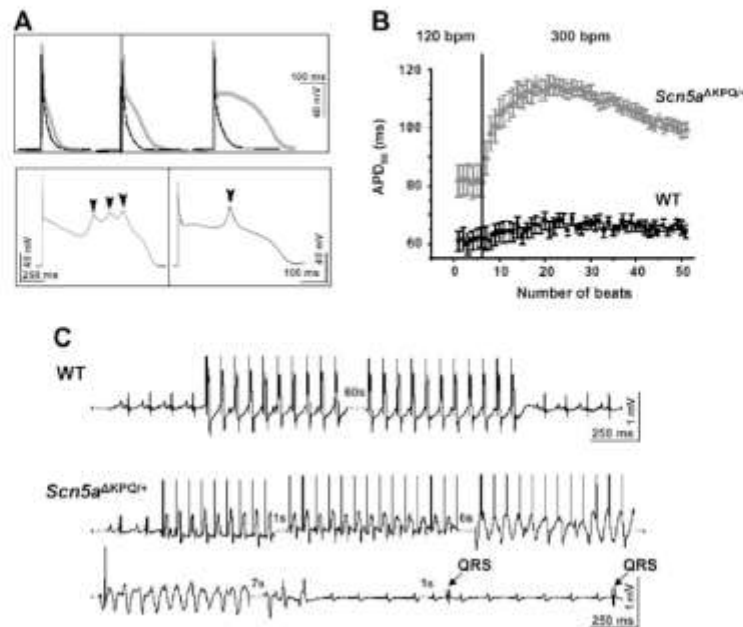


Fig. 3. Abnormal repolarisation in *Scn5a*^{ΔKPO/+} mice. (A) Top panel: Representative action potentials recorded from right ventricular preparations at pacing rates of 300 (left), 120 (middle) and 30 (right) beats per minute. Thick line, *Scn5a*^{ΔKPO/+} mouse; thin line, wild-type mouse. Bottom panel: Spontaneous development of early afterdepolarisations (arrowheads) in the right ventricle of a *Scn5a*^{ΔKPO/+} mouse at a pacing rate of 30 beats per minute (left) or upon sudden increase in pacing rate from 120 to 300 beats per minute (right). (B) Transient prolongation of action potential duration at 90% of full repolarisation (APD₉₀) upon sudden increase in pacing rate from 120 to 300 beats per minute (indicated by vertical dotted line) in *Scn5a*^{ΔKPO/+} mice but not in wild-type (WT) mice. (C) In a WT mouse, intraventricular pacing at 800 beats per minute for 1 min did not induce arrhythmias. In contrast, in a *Scn5a*^{ΔKPO/+} mouse, sudden acceleration of the heart rate from baseline to 800 beats per minute by pacing caused ventricular complexes with alternating amplitude and duration, and induced polymorphic ventricular tachycardia persisting for 7 s after pacing termination. The arrhythmia was followed by normal atrial activity but a slow irregular ventricular rhythm (QRS) that progressively restored to sinus rate (not shown). Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Medicine 7, 1021–1027, 2001.

In summary, studies performed with the *Scn5a*^{Δ/+} mouse model provided results that were consistent with clinical data. They confirmed previous studies suggesting that arrhythmias in LQT3 syndrome may result from re-entries provoked by early afterdepolarisations. However, the occurrence of delayed afterdepolarisations was also clearly demonstrated in myocytes of *Scn5a*^{Δ/+} mice (Fredj et al., 2006). Studies of *Scn5a*^{Δ/+} mice have also provided a rationale for the use of Na⁺ channel blockers and pacing to prevent cardiac arrhythmias and sudden death in the context of LQT3, for which β-blockers have shown low efficacy. Finally, they suggest that Ca²⁺ channels might be an interesting pharmacological target to prevent arrhythmias.

3. hSCN5A-N1325S transgenic mouse model: An LQT3 model

The *SCN5A* mutation N1325S, located in the intracellular region between segments 4 and 5 of domain III of Na_v1.5 (Fig. 1), also causes LQT3 syndrome (Wang et al., 1995). *In vitro* studies in *Xenopus* oocytes (Dumaine et al., 1996) or transfected mammalian cell lines (Wang et al., 1996) have shown that N1325S mutation, like many similar mutations, leads to an increased late persistent inward Na⁺ current. A transgenic mouse with cardiac selective expression of human *SCN5A*-N1325S mutation under the control of the mouse α-myosin heavy chain promoter was established (Tian et al., 2004). Transgenic mice showed some of the typical features of the LQT3 syndrome such as prolonged QT interval (Fig. 2B), ventricular arrhythmias and a high rate of sudden death due to documented polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. However, transgenic mice were also characterised by

increased heart rate and shorter PR intervals that are not observed in LQT3 patients. Some of these features might result from over-expression of the channel rather than from the mutation itself. Indeed, short PR interval has also been observed in a mouse model over-expressing wild-type hSCN5A gene (Zhang et al., 2007).

Voltage-clamp experiments on cardiomyocytes isolated from wild-type and hSCN5A-N1325S mice confirmed what had been previously described in heterologous expression systems, i.e. that the N1325S mutation did not modify the peak current but delayed the inactivation process and generated a late persistent current (Tian et al., 2004), which decreased with increasing pacing rates (Yong et al., 2007). Action potentials from hSCN5A-N1325S ventricular myocytes were longer than wild-type ones and exhibited early afterdepolarisations. As in *Scn5a*^{Δ/+} mice, mexiletine shortened ventricular action potential duration and prevented arrhythmias (Tian et al., 2004). Interestingly, action potential duration of transgenic but not wild-type myocytes paradoxically increased with pacing rate (Tian et al., 2004) and became highly variable with occurrence of repolarisation alternans (Yong et al., 2007). Whether this phenomenon was only transient, as in *Scn5a*^{Δ/+} mice, or persisted during long periods of increased pacing rate is unclear. The Ca²⁺ channel blocker verapamil reduced these alternans, suggesting an involvement of intracellular Ca²⁺ deregulation in this phenomenon. This idea is in accordance with previous studies showing that patients with LQT1–3 syndromes can exhibit T-wave alternans during sinus tachycardia (Cruz Filho et al., 2000; Viskin et al., 2004).

Like the *Scn5a*^{Δ/+} mouse model, the hSCN5A-N1325S mouse provided key information to our understanding of LQT3 syndrome.

For instance, the results presented above suggest that the N1325S mutation in *SCN5A* can explain both bradycardia- and non-bradycardia-related arrhythmias observed in patients carrying this mutation (Yong et al., 2007). However, the model might be taken with caution because of the important limitations linked to the over-expression of the channel.

4. *Scn5a* knockout mouse model: A Brugada and PCCD model

The Brugada syndrome is a severe genetic disease which associates ECG anomalies (i.e. a ST-segment elevation in the right pre-cordial leads V1 to V3 often with signs of conduction slowing) with a high risk of sudden cardiac death secondary to ventricular tachycardia or fibrillation (Gussak et al., 1999; Antzelevitch et al., 2005). In 20–30% of the patients, the disease is related to mutations in *SCN5A* virtually all leading to a complete or partial loss of function of $\text{Na}_v1.5$ (Tan et al., 2003). Loss-of-function mutations are also responsible for inherited Progressive Cardiac Conduction Defects (PCCD), also called Lev-Lenègre disease (Schott et al., 1999), or non-progressive conduction defects (Tan et al., 2001). PCCD is a slowly evolving lifespan disease that progressively affects cardiac conduction leading ultimately to pacemaker implantation to prevent the risk of complete atrioventricular block and Stokes-Adams syncope. Inherited PCCD associates haploinsufficiency of *SCN5A* together with an additional yet unknown mechanism related to aging (Probst et al., 2003). Despite their major clinical differences, Brugada syndrome and inherited conduction diseases share common features. First, they can be both caused by haploinsufficiency of *SCN5A*. Second, *SCN5A*-linked Brugada patients exhibit altered conduction whereas Brugada patients not related to *SCN5A* do not (Smits et al., 2002). Finally, both Brugada syndrome and PCCD can be found in the same pedigree (Kynidt et al., 2001). In other families, patients carrying loss-of-function mutations can exhibit symptoms of Brugada syndrome, conduction disease and sick sinus syndrome, either combined or not (Smits et al., 2005). Severe forms of sick sinus syndrome with absent P waves, long pauses (over 5 s) and low escape rhythms, have also been found in patients with double inheritance of *SCN5A* loss-of-function mutations (Benson et al., 2003).

A mouse model with targeted disruption of *Scn5a* gene has been established (Papadatos et al., 2002). Homozygous knockout mouse embryos die during mid-gestation due to severe defects in ventricular morphogenesis whereas heterozygous (*Scn5a*^{+/-}) mice show normal survival. In the initial report, it was shown that 8–10 week-old *Scn5a*^{+/-} mice have several cardiac defects including decreased atrial and atrio-ventricular conduction, as well as increased inducibility of ventricular arrhythmias (Papadatos et al., 2002). Following this initial report, the model was further analysed to investigate the potential pathophysiological mechanisms involved in the progressive evolution of *SCN5A*-related PCCD (Royer et al., 2005; van Veen et al., 2005). We found that in addition to atrial and atrio-ventricular conduction, ventricular conduction also decreased (Fig. 2). Moreover, ECG studies performed on mice ranging from 4 to 71 weeks of age showed that the ventricular phenotype of *Scn5a*^{+/-} mice worsened with age. This feature was confirmed by activation mapping studies performed in Langendorff-perfused hearts. In young *Scn5a*^{+/-} mice, conduction velocity was only affected in the right ventricle. In old mice, right ventricular conduction defect worsened and was in addition associated with conduction velocity defect in the left ventricle. This age-dependent deterioration of ventricular conduction was associated with the occurrence of fibrosis in ventricular myocardium. In some aspects, this phenotype resembles Lenègre–Lev disease, although in the latter fibrosis was found to be limited to the conduction system area (Lenègre and Moreau, 1963; Lev, 1964). Whether fibrosis is a direct consequence of $\text{Na}_v1.5$ loss of function is still an

open question. However, it is worth noting that fibrosis has been recently found in patients with the Brugada syndrome (Frustaci et al., 2005; Coronel et al., 2005). Whatever its triggering mechanism is, fibrosis, as well as redistribution of connexin 43 expression, most likely contributes to the age-dependent degradation of ventricular conduction in the mouse model. Whether the seducing hypothesis that *SCN5A*-related inherited PCCD in human also results from a primary decrease in Na^+ current and a secondary progressive fibrosis with aging remains to be clarified. In this context, *Scn5a*^{+/-} mice represent a promising tool for testing preventive therapies as an alternative to pacemaker implantation.

In addition, *Scn5a*^{+/-} mice turned out to be very useful in understanding the role of Na^+ channels in normal sino-atrial (SA) node function and the pathophysiology of sinus node dysfunction associated to *SCN5A* loss-of-function mutations (Benson et al., 2003; Smits et al., 2005). Indeed, *Scn5a*^{+/-} mice also display moderate bradycardia that can be associated with occasional SA blocks in older animals (Lei et al., 2005). Lei et al. showed that small central SA node cells, which do not express $\text{Na}_v1.5$, exhibited normal intrinsic pacemaker rate. In contrast, larger peripheral SA node cells, which normally express $\text{Na}_v1.5$, exhibited reduced intrinsic pacemaker rate associated to reduced expression of $\text{Na}_v1.5$. These data were consistent with the slower SA conduction and frequent SA conduction blocks observed in *Scn5a*^{+/-} SA node preparations compared to wild-type although they exhibited normal activation patterns. These findings were successfully reproduced in a computer model that directly implicated I_{Na} in action potential propagation through the SA node, from SA node to atria, and in modifying heart rate through a coupling of SA node and atrial cells.

5. *Scn5a*-1798insD knock-in mouse model: An overlap syndrome model

In 1999, Bezzina and co-workers described a *SCN5A* mutation (1795insD; Fig. 1) associated with an overlap syndrome of cardiac Na^+ channelopathies in a large Dutch family. The patients' ECG presented features of bradycardia, conduction disease, LQT3 and Brugada syndrome (Bezzina et al., 1999). Interestingly, the analysis of the biophysical properties of the 1795insD mutation led to contrasting results depending on the heterologous expression system used. In *Xenopus* oocytes, the mutation reduced the Na^+ current through a negative shift in voltage-dependence of steady-state inactivation but noticeably did not produce the persistent current commonly observed in LQT3 (Bezzina et al., 1999). In marked contrast, in HEK293 cells, 1795insD mutation had two consequences (Veldkamp et al., 2000). First, it disrupted fast inactivation leading to sustained inward Na^+ current that could prolong repolarisation at slow heart rates. But at the same time, it increased slow inactivation, delaying recovery of Na^+ channel availability between stimuli and reducing the Na^+ current under conditions mimicking fast heart rates. Computer modelling showed that this dual mechanism could indeed explain the overlap syndrome, depending on the heart rate (Clancy and Rudy, 2002). Because of these discrepancies and because the co-inheritance of other genetic variants besides the 1795insD mutation as a cause of the phenotype complexity in the family could not be ruled out, Remme and co-workers generated a knock-in mouse carrying the mouse equivalent (1798insD) of the human *SCN5A*-1795insD mutation (Remme et al., 2006; Fig. 2). Whereas homozygous mice are not viable, heterozygous *Scn5a*^{1798insD/+} mice recapitulate many of the pathological features of the patients including sinus node dysfunction, conduction slowing, and QT prolongation at slow rates. As expected from previous studies in heterologous expression system, patch-clamp experiments in ventricular *Scn5a*^{1798insD/+} cardiomyocytes have shown that action potential duration was prolonged

compared with wild-type cardiomyocytes and that this prolongation was more pronounced at slow pacing rates. Also, at fast pacing rates, action potential upstroke velocity, which reflects Na^+ channel availability, was reduced in $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ mice compared to wild-type. However, and puzzling enough, the potential biophysical mechanisms thought to explain decreased availability of Na^+ channels in heterologous expression systems were not confirmed in $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ mice. Indeed, rather than changes in the voltage dependence of activation and inactivation or slow inactivation properties, dysfunctional mutant channels at the membrane or ineffective trafficking of mutant channels to the membrane more likely explained the marked decrease of Na^+ current in $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ mice. In addition, a small persistent inward Na^+ current was found in $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ cardiomyocytes, explaining the prolongation of action potential duration and QT interval. These studies constitute another example of the limitations of heterologous expression systems and illustrate the benefits of genetically engineered mouse models.

In conclusion, the phenotypic characterisation of this mouse model has demonstrated that a single *SCN5A* mutation is sufficient to cause an overlap syndrome of cardiac Na^+ channel diseases. This unique mouse model also represents a useful tool to investigate the impact of genetic and environmental modifiers on cardiac conduction and repolarisation. Remme et al. (2008) have already shown that the phenotype severity of mice carrying the $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ mutation vary depending on the mouse genetic background. This variability is associated with differential expression of a large number of genes including some encoding ion channels. These authors are currently trying to identify the genetic modifier loci involved.

6. *Scn1b* knockout mouse: A scheming model

The cardiac Na^+ channel is a heterotrimer composed of $\text{Na}_v1.5$, the pore-forming α subunit, and two auxiliary β subunits (Meadows and Isom, 2005): a non-covalently linked $\beta 1$ subunit (or $\beta 3$) and a disulphide-linked subunit ($\beta 2$ or $\beta 4$). Recently, in a genetic screening of 282 probands with Brugada syndrome and 44 with conduction disease, none of whom had mutations in *SCN5A* gene, 3 mutations in the gene encoding the $\beta 1$ subunit (*SCN1B*) were identified in 3 kindreds (Watanabe et al., 2008). Two of these mutations were located in a newly described alternately spliced transcript, $\beta 1B$ (Qin et al., 2003). Both transcripts are expressed in human heart and to a greater extent in Purkinje fibres than in ventricular myocardium (Watanabe et al., 2008). The E87Q mutation, located in the extracellular immunoglobulin loop of both $\beta 1$ and $\beta 1B$ subunits, was identified in a family affected by conduction disease. The 2 other mutations (c.536G → A and c.537G → A) resulted in a $\beta 1B$ subunit truncated after the amino acid tryptophan-179. They were identified in a family affected with both Brugada syndrome and conduction disease and in a kindred affected with conduction disease. Biophysical studies showed that the Na^+ current was lower when $\text{Na}_v1.5$ was co-expressed with mutant $\beta 1$ and $\beta 1B$ subunits vs. wild-type subunits. This result was consistent with the phenotypes of the patients.

The cardiac electrophysiological phenotype of a mouse model invalidated for *Scn1b* markedly differed from the phenotype of the patients presented above (Lopez-Santiago et al., 2007). Compared to wild-type mice, *Scn1b* knockout mice exhibited lower heart rates and prolonged QT intervals, without any signs of conduction defects. Surprisingly, in acutely dissociated ventricular myocytes, loss of $\beta 1$ expression resulted in a 1.6-fold increase in both peak and persistent Na^+ current while channel gating and kinetics were unaffected. This increase in current was most likely related to the 1.3-fold increased expression of $\text{Na}_v1.5$ observed in these mice. Immunostaining of individual myocytes or ventricular sections

revealed no discernible alterations in the localisation of Na^+ channel α or β subunits. Action potential recordings in acutely dissociated ventricular myocytes showed prolonged repolarisation, supporting the increased QT interval. Together, these results suggest that $\beta 1$ subunit is critical for normal cardiac excitability and that loss of $\beta 1$ subunit may be associated with a long QT phenotype. Interestingly, the phenotype of *Scn1b* knockout mice resembles that found in a family of patients carrying a mutation on *SCN4B*, the gene encoding the $\beta 4$ subunit. As LQT3 patients, this kindred exhibits a markedly prolonged QT interval, which is due to a large increase of the late Na^+ current amplitude (Medeiros-Domingo et al., 2007).

7. Conclusion

Most mouse models of *SCN5A*-related cardiac channelopathies convincingly recapitulate most of the diverse clinical phenotypes observed in patients. The $\text{Scn5a}^{1798\text{insD}/+}$ mice as well as the models for LQT3 or overlap syndromes exhibit cardiac ECG and arrhythmia phenotypes very similar to those seen in patients. However, mouse models also have their own limitations as a phenotype observed in mice may not be encountered in patients. For example, the *Scn1b* knockout mouse shows prolonged ventricular repolarisation, a feature that is not seen in patients with *SCN1B* loss-of-function mutations. Whether these discrepancies relate to species differences or to differences between a heterozygous point mutation and complete inactivation of a gene on one allele remain to be clarified.

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

Finally, mouse models of $\text{Na}_v1.5$ (or $\text{Na}_v1.5$ -associated proteins) dysfunction offer the unique opportunity to investigate the cellular consequences of *SCN5A* mutations such as remodelling of other gene expression, which is hardly accessible in the hearts of patients, but that might participate in the overall phenotype and explain some of the differences among patients. They also constitute useful tools for future studies addressing as yet unanswered questions, such as the role of genetic and environmental modifiers on cardiac conduction and repolarisation.

Perhaps the most exciting benefit of mouse models is that they raise new working hypotheses such as the putative link between $\text{Na}_v1.5$ loss of function and occurrence of fibrosis in the context of progressive cardiac conduction disease, thereby providing new potential therapeutic approaches.

Acknowledgements

The authors wish to thank the ANR GIS—Institut des Maladies Rares (FC; A05224GS project) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FC; DCV20070409253 project) for their financial support. A.B. is supported by a scholarship from the Fondation Genavie.

References

- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggreffe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., Le Marec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A.R., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Tan, H., Wilde, A., 2005. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111, 659–670.
- Benson, D.W., Wang, D.W., Dymont, M., Krilans, T.R., Fish, F.A., Strieper, M.J., Rhodes, T.H., George Jr., A.L., 2003. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*). *J. Clin. Invest.* 112, 1019–1028.

- Bezzina, C., Veldkamp, M.W., van den Berg, M.P., Postma, A.V., Rook, M.B., Viersma, J.W., van Langen, I.M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M.T., van Der Hout, A.H., Mannens, M.M., Wilde, A.A., 1999. A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ. Res.* 85, 1206–1213.
- Charpentier, F., Demolombe, S., Escande, D., 2004. Cardiac channelopathies: from men to mice. *Ann. Med.* 36 (Suppl. 1), 28–34.
- Clancy, C.E., Rudy, Y., 2002. Na⁺ channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 105, 1208–1213.
- Coronel, R., Casini, S., Koopmann, T.T., Wilms-Schopman, F.J., Verkerk, A.O., de Groot, J.R., Bhuiyan, Z., Bezzina, C.R., Veldkamp, M.W., Linssenbank, A.C., van der Wal, A.C., Tan, H.L., Brugada, P., Wilde, A.A., de Bakker, J.M., 2005. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* 112, 2769–2777.
- Cruz Filho, F.E., Mala, I.G., Fagundes, M.L., Barbosa, R.C., Alves, P.A., Sá, R.M., Boghossian, S.H., Ribeiro, J.C., 2000. Electrical behavior of T-wave polarity alternans in patients with congenital long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 167–173.
- Dumaine, R., Wang, Q., Keating, M.T., Hartmann, H.A., Schwartz, P.J., Brown, A.M., Kirsch, E., 1996. Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circ. Res.* 78, 916–924.
- Ellinor, P.T., Nam, E.G., Shea, M.A., Milan, D.J., Ruskin, J.N., MacRae, C.A., 2008. Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 5, 99–105.
- Fabritz, L., Kirchhof, P., Franz, M.R., Nuyens, D., Rossenbacker, T., Ottenhof, A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Carmeliet, E., Carmeliet, P., 2003. Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKQPQ SCNSA (long QT3) mice. *Cardiovasc. Res.* 57, 1085–1093.
- Fredl, S., Lindegger, N., Sampson, K.J., Carmeliet, P., Kass, R.S., 2006. Altered Na⁺ channels promote pause-induced spontaneous diastolic activity in long QT syndrome type 3 myocytes. *Circ. Res.* 99, 1225–1232.
- Frustaci, A., Priori, S.G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., Sanna, T., Bellotti, F., Russo, M.A., 2005. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* 112, 3680–3687.
- Gilmour Jr., R.F., 2003. A novel approach to identifying antiarrhythmic drug targets. *Drug Discov. Today* 8, 162–167.
- Groenewegen, W.A., Frouzi, M., Bezzina, C.R., Vliet, S., van Langen, I.M., Sandkuijl, L., Smits, J.P., Hulsbeek, M., Rook, M.B., Jongma, H.J., Wilde, A.A., 2003. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ. Res.* 92, 14–22.
- Gussak, I., Antzelevitch, C., Bjerregaard, P., Towbin, J.A., Chaitman, B.R., 1999. The Brugada syndrome: clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 5–15.
- Head, C.E., Balasubramanian, R., Thomas, G., Goddard, C.A., Lei, M., Colledge, W.H., Grace, A.A., Huang, C.L., 2005. Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in DeltaKQPQ Scn5a mice. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 16, 1329–1340.
- Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevalier, J.C., Baró, I., Moisan, J.P., Boisseau, P., Schott, J.J., Escande, D., Le Marec, H., 2001. Novel SCNSA mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104, 3081–3086.
- Laitinen-Forsblom, P.J., Mäkinen, P., Mäkinen, H., Yli-Mäyry, S., Virtanen, V., Kontula, K., Aalto-Setälä, K., 2006. SCNSA mutation associated with cardiac conduction defect and atrial arrhythmias. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17, 480–485.
- Lei, M., Goddard, C., Liu, J., Leoni, A.L., Royer, A., Fung, S.S., Xiao, G., Ma, A., Zhang, H., Charpentier, F., Vandenberg, J.L., Colledge, W.H., Grace, A.A., Huang, C.L., 2005. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene Scn5a. *J. Physiol.* 567, 387–400.
- Lenègre, J., Moreau, P., 1963. Le bloc auriculo-ventriculaire chronique. Étude anatomique, clinique et histologique. *Arch. Mal. Cœur* 56, 867–888.
- Lev, M., 1964. Anatomical basis for atrioventricular block. *Am. J. Med.* 37, 742–748.
- Lopez-Santiago, L.F., Meadows, L.S., Ernst, S.J., Chen, C., Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Speelman, A., Noebels, J.L., Maier, S.K., Lopatin, A.N., Isom, L.L., 2007. Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 636–647.
- McNaic, W.P., Ku, L., Taylor, M.R., Fain, P.R., Dao, D., Wölfel, E., Mestroni, L., Familial Cardiomyopathy Registry Research Group, 2004. SCNSA mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 110, 2163–2167.
- Meadows, L.S., Isom, L.L., 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc. Res.* 67, 448–458.
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D.J., Iturralde-Gómez, P., Ity, A., Ye, B., Vaidya, C., Deda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M.T., Makieleski, J.C., Ackerman, M.J., 2007. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134–142.
- Moss, A.J., 2002. T-wave patterns associated with the hereditary long QT syndrome. *Card. Electrophysiol. Rev.* 6, 311–315.
- Moss, A.J., Kass, R.S., 2005. Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J. Clin. Invest.* 115, 2018–2024.
- Nerbonne, J.M., Nichols, C.G., Schwarz, T.L., Escande, D., 2001. Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* 89, 944–956.
- Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compemolle, V., Rudy, Y., Smits, J.P., Flammang, W., Clancy, C.E., Moons, L., Vos, M.A., Dewerschin, M., Benndorf, K., Colten, D., Carmeliet, E., Carmeliet, P., 2001. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat. Med.* 7, 1021–1027.
- Papadatos, G.A., Wallerstein, P.M., Head, C.E., Ratchiff, R., Brady, P.A., Benndorf, K., Saumarez, R.C., Trezise, A.E., Huang, C.L., Vandenberg, J.L., Colledge, W.H., Grace, A.A., 2002. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6210–6215.
- Priori, S.G., Schwartz, P.J., Napolitano, C., Bloise, R., Rucchietti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., Follì, R., Cappelletti, D., 2003. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1866–1874.
- Probst, V., Kyndt, F., Potet, F., Trochu, J.N., Mialot, G., Demolombe, S., Schott, J.J., Baró, I., Escande, D., Le Marec, H., 2003. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCNSA-linked hereditary Lenègre disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 643–652.
- Qin, N., D'Andrea, M.R., Lubin, M.L., Shafiq, N., Codd, E.E., Correa, A.M., 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur. J. Biochem.* 270, 4762–4770.
- Remme, C.A., Verkerk, A.O., Nuyens, D., van Ginneken, A.C., van Brunschot, S., Belterman, C.N., Wilders, R., van Roon, M.A., Tan, H.L., Wilde, A.A., Carmeliet, P., de Bakker, J.M., Veldkamp, M.W., Bezzina, C.R., 2006. Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCNSA-1795insD. *Circulation* 114, 2584–2594.
- Remme, C.A., Wilde, A.A., Bezzina, C.R., 2008. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCNSA mutations. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 78–87.
- Royer, A., van Veen, T.A., Le Bouter, S., Marionneau, C., Grinl-Charhibil, V., Leoni, A.L., Steenman, M., van Rijen, H.V., Demolombe, S., Goddard, C.A., Richer, C., Escoubet, B., Jarry-Guichard, T., Colledge, W.H., Gros, D., de Bakker, J.M., Grace, A.A., Escande, D., Charpentier, F., 2005. Mouse model of SCNSA-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* 111, 1738–1746.
- Sabir, I.N., Li, L.M., Jones, V.J., Goddard, C.A., Grace, A.A., Huang, C.L., 2008. Criteria for arrhythmogenicity in genetically-modified Langendorff-perfused murine hearts modelling the congenital long QT syndrome type 3 and the Brugada syndrome. *Pflügers Arch.* 455, 637–651.
- Schott, J.J., Aishinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T.M., Hulsbeek, M., Wilde, A.A., Escande, D., Mannens, M.M., Le Marec, H., 1999. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCNSA. *Nat. Genet.* 23, 20–21.
- Schwartz, P.J., Priori, S.G., Spazzolini, C., Moss, A.J., Vincent, G.M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M.T., Towbin, J.A., Beggs, A.H., Brink, P., Wilde, A.A., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J.L., Timothy, K.W., Corfield, V., Watanabe-rihaga, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M.H., Schwartz, K., Coumel, P., Bloise, R., 2001. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103, 89–95.
- Smits, J.P., Eckardt, L., Probst, V., Bezzina, C.R., Schott, J.J., Remme, C.A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Escande, D., Schulze-Bahr, E., LeMarec, H., Wilde, A.A., 2002. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCNSA-related patients from non-SCNSA-related patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 350–356.
- Stokoe, K.S., Thomas, G., Goddard, C.A., Colledge, W.H., Grace, A.A., Huang, C.L., 2007. Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of Scn5a+/Δ Delta murine hearts modelling long QT syndrome 3. *J. Physiol.* 578, 69–84.
- 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., Balse, J.R., 2001. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409, 1043–1047.
- Tan, H.L., Bezzina, C.R., Smits, J.P., Verkerk, A.O., Wilde, A.A., 2003. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc. Res.* 57, 961–973.
- Thomas, G., Gurung, I.S., Killeen, M.J., Hakim, P., Goddard, C.A., Mahaut-Smith, M.P., Colledge, W.H., Grace, A.A., Huang, C.L., 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.* 578, 85–97.
- Tian, X.L., Yong, S.L., Wan, X., Wu, L., Chung, M.K., Tchou, P.J., Rosenbaum, D.S., Van Wagoner, D.R., Kirsch, G.E., Wang, Q., 2004. Mechanisms by which SCNSA mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc. Res.* 61, 256–267.
- van Veen, T.A., Stein, M., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Colledge, W.H., Huang, C.L., Wilders, R., Grace, A.A., Escande, D., de Bakker, J.M., van Rijen, H.V., 2005. Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 112, 1927–1235.
- Veldkamp, M.W., Viswanathan, P.C., Bezzina, C., Baartscheer, A., Wilde, A.A., Balse, J.R., 2000. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multi-dysfunctional Na⁺ channel. *Circ. Res.* 86, E91–E97.
- Viskin, S., Rosso, R., Rogowski, O., Belhassen, B., Levitas, A., Wagshal, A., Katz, A., Furey, D., Zeltser, D., Oliva, A., Pollevick, G.D., Antzelevitch, C., Rozovski, U., 2004. Provocation of sudden heart rate oscillation with adenosine exposes abnormal QT responses in patients with long QT syndrome: a bedside test for diagnosing long QT syndrome. *Eur. Heart J.* 27, 469–475.

Author's personal copy

E. Charpentier et al. / Progress in Biophysics and Molecular Biology 98 (2008) 230–237

237

- Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G.M., Priori, S.G., Schwartz, P.J., Keating, M.T., 1995. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1603–1607.
- Wang, D.W., Yazawa, K., George Jr., A.L., 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.
- Watanabe, H., Koopmann, T.T., Le Souarnec, S., Yang, T., Ingram, C.R., Schott, J.J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., Wiesfeld, A.C., Pfeufer, A., Kääh, S., Wichmann, H.E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A.A., Roden, D.M., Bezzina, C.R., 2008. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J. Clin. Invest.* 118, 2260–2268.
- Yong, S.L., Ni, Y., Zhang, T., Tester, D.J., Ackerman, M.J., Wang, Q.K., 2007. Characterization of the cardiac sodium channel SCN5A mutation, N1325S, in single murine ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 378–383.
- Zhang, T., Yong, S.L., Tian, X.L., Wang, Q.K., 2007. Cardiac-specific overexpression of SCN5A gene leads to shorter P wave duration and PR interval in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 444–450.

4. Synthèse et régulation du canal Nav1.5

4.1 Synthèse du canal Nav1.5

Les canaux ioniques sont synthétisés par la « voie sécrétoire », c'est-à-dire qu'ils sont formés dans le réticulum endoplasmique (RE) puis exportés vers l'appareil de Golgi, où ils subissent les modifications post-traductionnelles avant d'atteindre la membrane plasmique où ils exercent leur fonction.

4.1.1 Adressage des canaux vers le réticulum endoplasmique

L'ARNm est traduit dans un premier temps dans le cytoplasme jusqu'à l'émergence d'une séquence signal dans l'extrémité N-terminale reconnue par la particule de reconnaissance du signal (Signal Recognition Particule, SRP), qui permet la liaison de la séquence peptidique néoformée à la membrane du RE. Ce peptide en élongation, lié au ribosome, se lie à un pore aqueux, le translocon, qui permet l'entrée du peptide dans la lumière du RE et son insertion dans la bicouche lipidique. La protéine ainsi formée est directement intégrée dans la membrane du RE (Figure 7) (Deutsch 2003).

Le canal Nav1.5 est un canal à quatre domaines de six segments transmembranaires dont chaque segment est vraisemblablement intégré à la bicouche lipidique au cours de l'élongation peptidique. L'extrémité N-terminale est située dans la lumière du RE, les segments transmembranaires hydrophobes sont retenus par le translocon dans la membrane du RE, un signal « transfer-stop » arrête la translocation. L'élongation se poursuit dans le cytoplasme ou dans la lumière du RE jusqu'à ce qu'un signal de ré-initiation provoque l'entrée d'un nouveau segment hydrophobe dans le translocon (Do *et al.* 1996; Sakaguchi 2002). Ce mécanisme se répète jusqu'à la synthèse finale du dernier segment. Le nombre total de segments étant pair, l'extrémité C-terminale hydrophile est emprisonnée dans la lumière du RE.

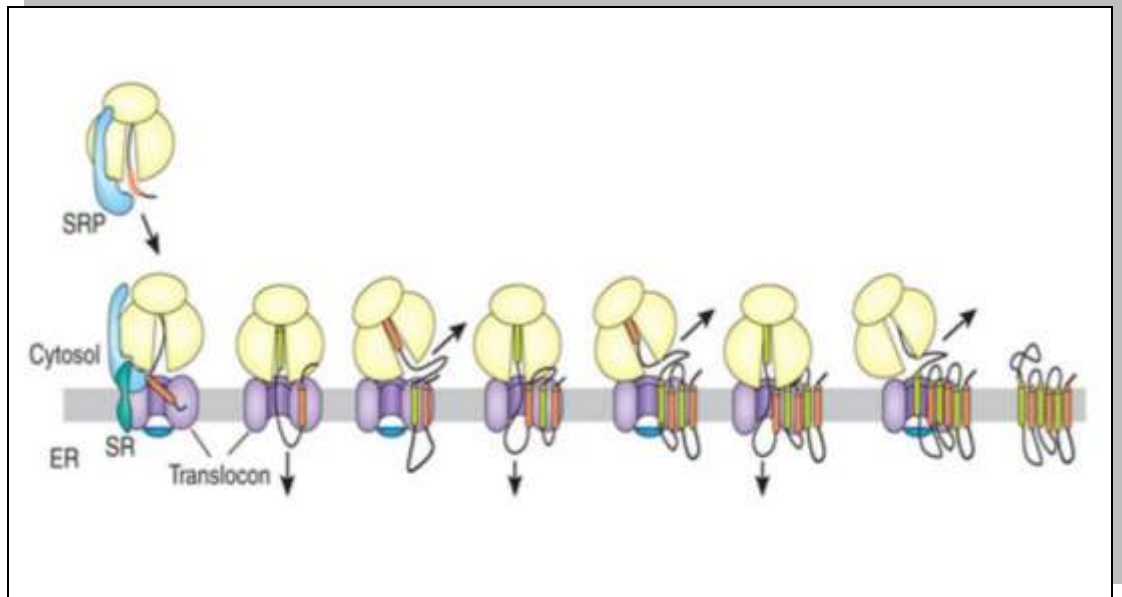


Figure 7: Synthèse des protéines membranaires.

L'ARNm est traduit par les ribosomes dans le cytoplasme jusqu'à la synthèse d'une séquence signal SRP, qui dirige le complexe ARNm-ribosome vers le RE. La séquence peptidique émergente avec une séquence signal (cylindres oranges) stimule l'attachement du ribosome au translocon et permet l'ouverture du pore du translocon (disque bleu). Les séquences de « stop-transfert » (cylindres verts) terminent la translocation et redirigent l'élongation de la chaîne peptidique naissante à partir du ribosome dans le cytoplasme. Chaque segment transmembranaire dirige le mouvement de la chaîne naissante dans le complexe ribosome-translocon définissant la topologie du canal (Skach 2009).

Les mécanismes d'orientation des segments dans la membrane sont actuellement peu connus, ils ont été identifiés pour quelques canaux potassiques, Kv1.3, KAT1, Kir2.1, KcsA, pour l'échangeur Na^+/H^+ , NHE1, et pour le canal chlorure, CFTR (Deutsch 2003; Y Sato *et al.* 2004).

Un autre mécanisme assure le repliement correct des protéines dans le RE, la N-glycosylation.

4.1.2 La N-glycosylation

La N-glycosylation consiste en l'attachement d'une chaîne d'oligosaccharides dans la lumière du RE, sur les groupements $-\text{NH}_2$ des résidus asparagines des sites consensus $-\text{Asn-X-Ser/Thr}$.

La N-glycosylation débute dans le RE et assure le repliement correct des protéines. Ce processus joue un rôle fondamental dans le contrôle qualité des protéines. Seules les protéines correctement repliées sont ensuite exportées dans l'appareil de Golgi où elles subissent la maturation golgienne. Les N-glycanes deviennent des structures très complexes à la suite de nombreuses modifications dont la sialylation qui consiste en la greffe d'acides sialiques sur les groupements N-glycanes. Les acides sialiques, chargés négativement au pH physiologique,

confèrent une charge aux glycoprotéines. La N-glycosylation joue un rôle important dans l'adressage des protéines et dans leur stabilité car elle les protège de la dégradation.

En 1982, Waechter et al, montraient que les VGSCs sont glycosylés. En fait, il semble que 25-30 % du poids moléculaire apparent (PM) de ces canaux sodiques seraient dus à des complexes d'oligosaccharides et presque la moitié correspondrait à des acides sialiques (Bennett 2002; Cohen et Levitt 1993).

La glycosylation des protéines du myocarde se modifie au cours de son développement (Stocker et Bennett 2006). Cela résulte en partie du fait que la glycosylation des VGSCs est dépendante des isoformes (Bennett 2002). Le canal sodique des muscles squelettiques Nav1.4, majoritaire dans le cœur néonatal, et les canaux neuronaux sont en effet plus glycosylés que Nav1.5. Seuls 5 % de la masse de Nav1.5 correspond à des oligosaccharides (Cohen et Levitt 1993; Marban *et al.* 1998). En effet, Nav1.5 est décrit pour avoir quatorze sites potentiels de glycosylation, mais il semblerait que seuls deux à six de ces sites soient réellement glycosylés alors que 80 % des sites de Nav1.4 sont glycosylés (Bennett 2002; Cohen et Levitt 1993). Les sites de glycosylation sont majoritairement situés sur le segment extracellulaire reliant les segments S5-S6 du domaine I (Bennett 2002).

La N-glycosylation joue un rôle important dans l'activité du canal Nav1.4, mais semble n'avoir aucun impact sur l'activité de Nav1.5. Cependant une étude récente montre une diminution de la glycosylation des canaux cardiaques chez des patients atteints de la maladie de Chagas⁷. Cette diminution d'acides sialiques provoque un rapide recouvrement de l'inactivation (Montpetit *et al.* 2009). Ce mécanisme a aussi été suggéré chez des patients souffrant de LQTS suite à des mutations trouvées dans ces sites de glycosylation (Montpetit *et al.* 2009).

Cependant, avant de pouvoir migrer vers l'appareil de Golgi, les canaux Nav1.5 sont retenus dans le RE par des motifs de rétention.

⁷ La maladie de Chagas est une maladie parasitaire due au *Trypanosoma cruzi*, elle sévit principalement en Amérique Latine et cible principalement le cœur en favorisant le développement des troubles de la conduction.

4.1.3 Réservoir de Nav1.5

Les motifs de rétention du RE sont des petites séquences d'acides aminés qui jouent un rôle fondamental dans la régulation du trafic des protéines à la surface cellulaire. Ces séquences, comme leur nom l'indique, retiennent les protéines dans le RE. Lorsque ces séquences sont, par exemple, masquées par des protéines chaperonnes, elles sont libérées du RE et peuvent migrer vers l'appareil de Golgi (Herfst *et al.* 2004).

Le canal Nav1.5 possède trois motifs de rétention RXR dans la boucle intracellulaire reliant les domaines DI-DII (Figure 9) (Zhou *et al.* 2002). Ce motif a été découvert en 1999 pour les canaux Kir6.2 et SUR1 (Zerangue *et al.* 1999).

L'équipe de Zhou a montré en 2000 une augmentation du courant sodique après stimulation de la protéine kinase A, PKA. Cette augmentation était perdue lorsque les cellules étaient traitées avec des inhibiteurs du recyclage membranaire, suggérant une implication de la PKA dans le trafic de Nav1.5 à la membrane plasmique (Zhou *et al.*, 2000). Cet effet de la PKA est aussi bloqué lorsque les sites de rétention du RE de Nav1.5 sont absents (Zhou *et al.* 2002). Etrangement, contrairement à ce qui est attendu, lorsque ces sites de rétention ne sont pas présents le courant sodique est diminué (Zhou *et al.* 2002). Ces résultats suggèrent que, pour le canal Nav1.5, ces sites de rétention sont sous le contrôle d'une phosphorylation dépendante de la PKA mais qu'ils ne semblent pas participer à la rétention des canaux dans le réticulum endoplasmique (Zhou *et al.* 2002).

Récemment une redistribution vers la membrane plasmique des canaux sodiques stockés en masse dans un compartiment cytoplasmique non défini, a été décrite suite à l'activation de la PKA (Hallaq *et al.* 2006). En parallèle, il a été montré par Yarbrough *et al.*, une association de Nav1.5 aux cavéoles (Yarbrough *et al.* 2002). Ces données suggèrent un mode particulier pour la régulation de Nav1.5 par ces motifs de rétention. En effet, il semblerait que plutôt que de jouer un rôle au niveau du RE les motifs de rétention soient impliqués dans la libération d'un réservoir de canaux Nav1.5 probablement localisé dans les cavéoles. Lorsqu'on active la PKA, il y aurait libération de ces canaux (Hallaq *et al.* 2006; Yarbrough *et al.* 2002).

Les canaux Nav1.5 appartiennent à des complexes protéiques. En effet, ils interagissent avec de nombreuses protéines qui semblent être des éléments importants pour leur stabilisation et leur trafic à la membrane.

4.2 Les protéines de régulation

La figure 9 regroupe les différentes protéines de Nav1.5 dans les cardiomyocytes.

4.2.1 Les sous-unités régulatrices

Le canal Nav1.5 est composé d'une sous-unité fonctionnelle α et de sous-unités régulatrices β . Les quatre gènes des sous-unités β sont exprimés dans le cœur (*SCN1B-SCN4B*) et codent les protéines Nav β_1 -Nav β_4 . Ce sont des protéines monomériques à un segment transmembranaire avec un domaine d'adhésion des molécules comme pour les immunoglobulines (CAM domain, Ig-like), permettant d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire (Isom et Catterall 1996). Les sous-unités β_1 , β_2 et β_3 ont été co-immunoprécipitées avec Nav1.5. Nav1.5 est relié à β_2 et β_4 par un pont disulfure (Isom *et al.* 1995; Valdivia *et al.* 2010; Yu *et al.* 2003) alors que β_1 et β_3 lient Nav1.5 de manière non covalente (Yu *et al.* 2003).

Les sous-unités β ont un rôle controversé dans la régulation des paramètres biophysiques du canal Nav1.5. Cependant, des mutations de ces sous-unités ont été trouvées chez des patients atteints de troubles du rythme cardiaque (Abriel 2010). Des mutations dans la sous-unité β_4 peuvent conduire à un QT long de type 10. Des mutations de β_3 et β_1 sont trouvées chez des patients souffrant d'un BrS et des fibrillations auriculaires ont été observées chez des patients mutés pour les sous-unités β_1 et β_2 (Abriel et Kass 2005). Étrangement, les souris KO pour le gène *Scn1b* développent un QT long (Lopez-Santiago *et al.* 2007).

Les sous-unités β semblent jouer un rôle important dans le trafic de Nav1.5 à la membrane : elles permettent de localiser spécifiquement Nav1.5. En fonction des canaux Nav exprimés et de leurs localisations, les sous-unités β impliquées ne sont pas les mêmes (Meadows et Isom 2005). Aux disques intercalaires, les canaux Nav1.5 sont colocalisés principalement avec les sous-unités β_2 et β_4 et légèrement avec la sous-unité β_1 phosphorylée. Aux T-tubules les isoformes β_1 , non phosphorylés, et β_3 sont majoritaires (Figure 8) (Maier *et al.* 2004; Malhotra *et al.* 2004).

Ainsi en fonction de sa localisation, la protéine Nav1.5 semble appartenir à des complexes protéiques différents.

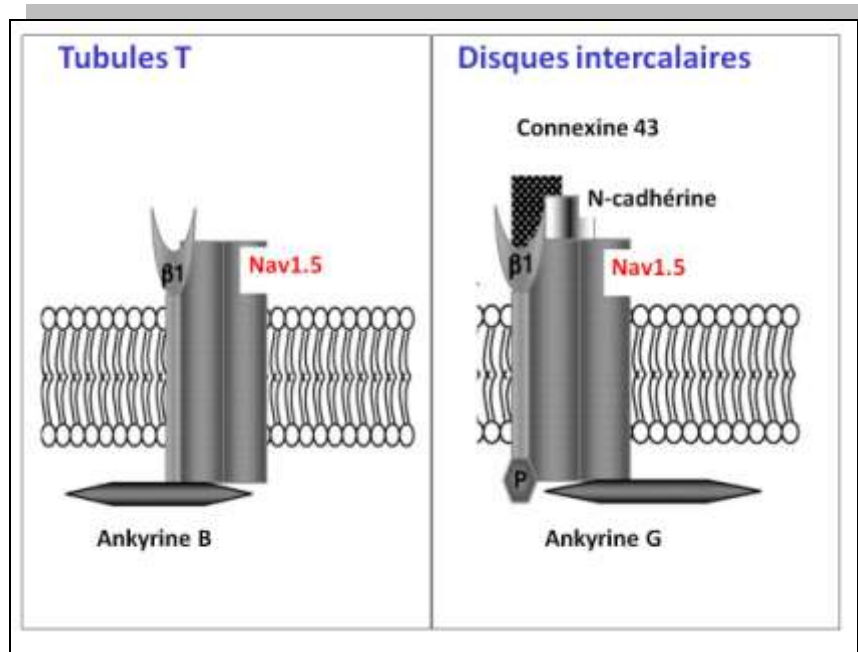


Figure 8: Les protéines partenaires liées à Nav1.5 sont différentes en fonction de la localisation de la protéine (Meadows et Isom 2005).

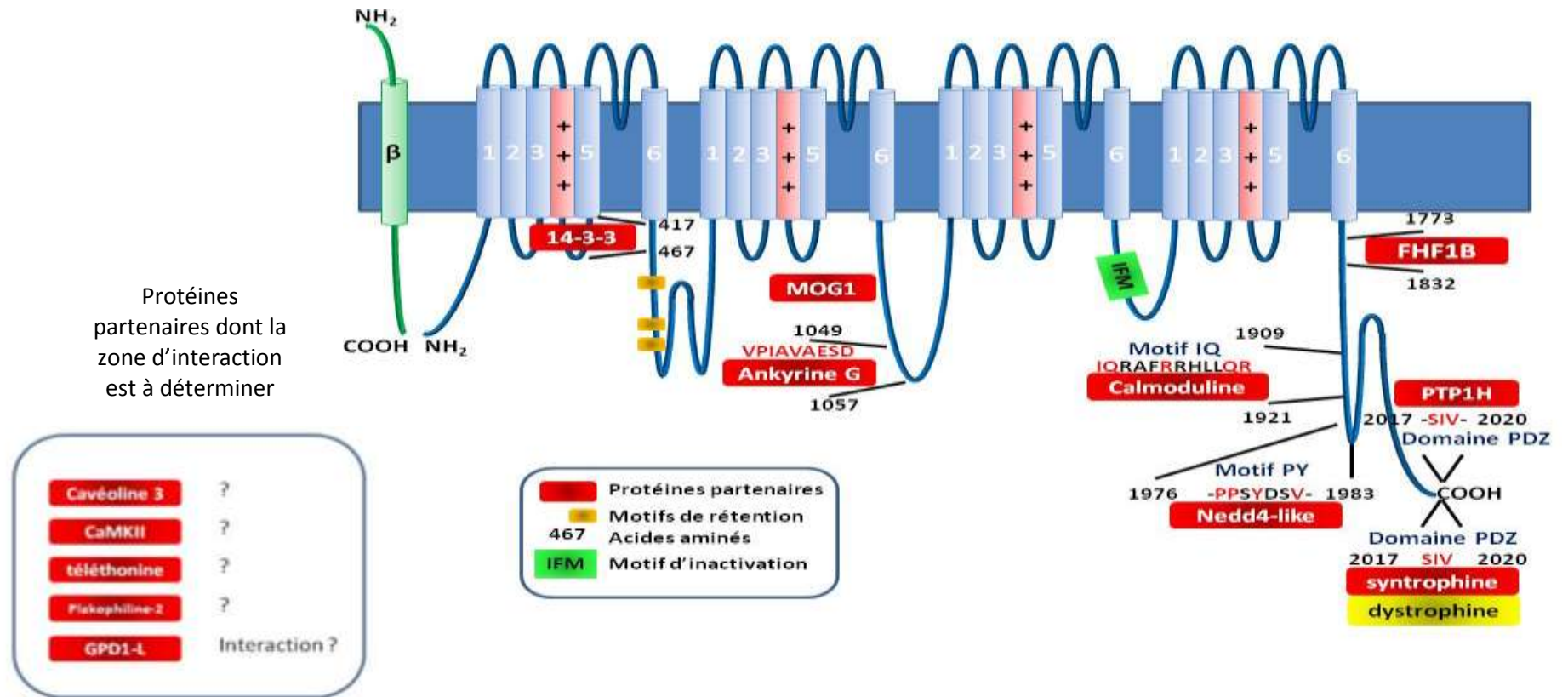


Figure 9: Représentation schématique du canal Nav1.5 et de ses protéines partenaires avec leurs zones d'association.

La protéine Nav1.5 est une protéine de 265 kDa, glycosylée, interagissant avec de nombreuses protéines, marquées ici en rouge. Certaines zones d'interaction avec ces protéines partenaires restent encore à établir (encadré à gauche). Pour GPD1-L nous ne savons pas encore si Nav1.5 interagit directement avec cette protéine. L'extrémité C-terminale, est une grande zone d'associations protéiques. Deux protéines ont été décrites pour interagir avec le domaine PDZ, dont la syntrophine, qui permet de relier Nav1.5 à la grosse protéine du cytosquelette la dystrophine. L'ankyrine G et MOG1 lient Nav1.5 au niveau de la boucle intracytoplasmique II reliant les domaines DII et DIII. 14-3-3 interagit avec Nav1.5 dans la boucle intracytoplasmique I reliant DI-DII. Sur cette même boucle intracytoplasmique, trois motifs de rétention du RE de type RXR sont présents.

4.2.2 Le complexe Nav1.5 aux disques intercalaires

Le canal Nav1.5 est colocalisé au niveau des disques intercalaires avec : la téléthonine, 14-3-3, la plakophiline-2, MOG-1 et l'Ankyrine-G (Allouis *et al.* 2006; Marfatia *et al.* 2001; Mazzone *et al.* 2008; Mohler *et al.* 2004; Sato *et al.* 2009).

Il a été montré que la **téléthonine**, petite protéine sarcomérique sensible à la contraction cardiaque, module l'activité du canal Nav1.5 mais aussi des canaux potassiques. Une mutation de la téléthonine entraîne une diminution de l'activité du canal suite à la perte de l'interaction (Abriel 2010; Mazzone *et al.* 2008).

De même, la **plakophiline-2 (PKP2)**, protéine de structure des desmosomes, a aussi été reconnue pour jouer un rôle dans l'activité de Nav1.5 (Sato *et al.* 2009). La suppression de cette protéine conduit à une diminution du courant sodique liée à un déplacement de la courbe d'inactivation à l'état stable vers des potentiels plus négatifs et à un ralentissement de la levée d'inactivation (Sato *et al.* 2009). L'interaction de PKP2 avec Nav1.5 a bien été décrite. Toutefois nous ne savons toujours pas si elle est directe ou si elle a lieu grâce à d'autres protéines partenaires de Nav1.5 telle la protéine adaptatrice ankyrine G ou une des sous-unités β . Cependant, cette interaction permet un rapprochement stratégique de Nav1.5 aux jonctions communicantes (Abriel 2010; Oxford *et al.* 2007; Sato *et al.* 2009). PKP2 est aussi décrite pour lier la connexine43 (Cx43), protéine majeure des jonctions communicantes (Oxford *et al.* 2007).

En revanche, la protéine **14-3-3**, interagissant avec la boucle intracytoplasmique des domaines DI-DII de Nav1.5, a été décrite pour accélérer la levée de l'inactivation du canal lorsque les deux protéines sont exprimées dans un système d'expression hétérologue. Par contre, aucun effet de 14-3-3 sur le trafic de Nav1.5 n'a été décrit (Allouis *et al.* 2006). Les protéines 14-3-3 peuvent interagir avec de nombreuses protéines et sont cruciales dans les voies de signalisation, la croissance cellulaire, l'adhésion, la différenciation, l'apoptose et la régulation des canaux ioniques (Allouis *et al.* 2006). Six isoformes de 14-3-3 sont exprimés dans le cœur, mais nous ne savons pas encore comment ceux-ci interagissent avec Nav1.5 (Abriel 2010; Allouis *et al.* 2006).

La protéine MOG-1 et l'ankyrine-G ont été décrites pour moduler le trafic de Nav1.5 dans cette région.

L'interaction de **MOG-1** au niveau de la boucle intracytoplasmique des domaines DII-DIII de Nav1.5 influence le trafic de Nav1.5 (Marfatia *et al.* 2001; Wu *et al.* 2008). MoG-1 est une protéine décrite dans le transport nucléocytoplasmique chez la levure. Actuellement, nous ne

savons pas si la protéine joue sur le trafic antérograde ou rétrograde de Nav1.5 dans les cardiomyocytes (Wu *et al.* 2008).

L'**ankyrine G**, est une protéine adaptatrice qui lie le canal Nav1.5 au niveau de la boucle intracellulaire des domaines DII-DIII. Une mutation dans ce domaine est décrite dans le syndrome de Brugada (Mohler *et al.* 2004). Le nombre de canaux sodiques est diminué si cette interaction est rompue. Plus intrigant encore, en absence d'ankyrine G, le nombre de canaux Nav1.5 synthétisé est fortement diminué, alors que les canaux sodiques sont répartis sur d'autres faces des cardiomyocytes (Lowe *et al.* 2008).

Les canaux sodiques sont en effet aussi présents à la surface des tubules T et sur les membranes latérales des cardiomyocytes.

4.2.3 Le complexe Nav1.5 aux membranes latérales

Dans cette région, un autre isoforme de la famille des ankyrines est présent : l'ankyrine B. Des mutations de l'ankyrine B sont responsables d'une forme de QT long, le LQT4, n'impliquant aucune modification du courant I_{Na} (Mohler *et al.* 2003). Actuellement, aucune interaction directe de Nav1.5 et de l'ankyrine B n'a été décrite. Toutefois, les souris n'exprimant pas l'ankyrine B ont un phénotype proche du LQT3 et des protéines partenaires de Nav1.5 dans cette région pourraient les rapprocher (Chauhan *et al.* 2000).

En effet, la **syntrophine**, protéine adaptatrice, décrite pour interagir avec le domaine PDZ situé dans la partie C-terminale de Nav1.5, lie la dystrophine qui elle-même semble être liée à l'ankyrine B (Ayalon *et al.* 2008; Gavillet *et al.* 2006). Dans les souris mdx, un modèle de la myopathie de Duchenne, n'exprimant pas la dystrophine, le nombre de canaux Nav1.5 à la membrane est divisé par deux, alors que la quantité d'ARNm pour ces canaux n'est pas modifiée, suggérant un défaut de trafic des canaux à la membrane suite à l'absence de dystrophine (Gavillet *et al.* 2006). Des mutations du gène codant la syntrophine sont aussi répertoriées pour induire des LQTS (Ueda *et al.* 2008; Wu *et al.* 2008).

La dystrophine est une protéine du cytosquelette, essentielle à la structure des cellules musculaires. Elle colocalise et interagit aussi avec la **cavéoline-3** (Doyle *et al.* 2000). La cavéoline-3, constituant majeur des cavéoles, lie aussi les canaux sodiques (Yarbrough *et al.* 2002) et les mutations de son gène peuvent induire des LQTS de type 9, LQT9 (Vatta *et al.* 2006). Les cavéoles participent au stockage des canaux sodiques, comme nous l'avons vu précédemment.

La **calmoduline kinase de type II**, CamKII, phosphorylée ou non, coimmunoprécipite avec Nav1.5 dans les cardiomyocytes (Wagner *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2009). Ces protéines sont colocalisées aux tubules T. L'inhibition de la CamKII, provoque un déplacement de l'inactivation à l'état d'équilibre vers des potentiels plus négatifs et augmente le temps de levée de l'inactivation (Yoon *et al.* 2009). L'activité de la CamKII régule donc l'activité des canaux Nav1.5, probablement par un mécanisme dépendant d'une phosphorylation (Wagner *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2009).

4.2.4 Les autres protéines régulant Nav1.5

D'autres protéines dont la localisation précise dans les cardiomyocytes n'est pas établie telles que la Glycérol-3-Phosphate Pésyhydrogénase 1 Like (GPD-1L) mais aussi la calmoduline (CaM) qui est ubiquitaire, le facteur 1 homologue au facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor Homologous Factor 1B, FHF1B) et la tyrosine phosphatase (Protéine Tyrosine Phosphatase, PTPH1), participent aussi au trafic et à la régulation de l'activité des canaux Nav1.5.

La **Calmoduline**, une protéine capable de fixer le calcium, connue pour participer à de nombreux processus cellulaires dont la régulation de l'activité de nombreux canaux ioniques (Saimi et Kung 2002), se lie au motif IQ de l'extrémité C-terminale de Nav1.5 (Deschênes *et al.* 2002; Mori *et al.* 2000; Tan *et al.* 2002; Young et Caldwell 2005). Les effets de cette liaison sur l'activité du canal restent très controversés (Deschênes *et al.* 2002; Tan *et al.* 2002; Young et Caldwell 2005). Toutefois, cette liaison semblerait participer à la régulation de l'activité des canaux Nav1.5. La CaM agirait sur l'inactivation des canaux Nav1.5 par un mécanisme dépendant du calcium (Kim *et al.* 2004; Potet *et al.* 2009). La CaM fixée à l'extrémité C-terminale de Nav1.5 via le motif IQ, lie le calcium ce qui permettrait l'interaction du domaine EF-hand⁸ de Nav1.5 avec le motif IQ. Le complexe formé se rapprocherait de la boucle DIII-DIV, ou uniquement la calmoduline activée par le calcium, ce qui influencerait l'inactivation du canal (Figure 10) (Chagot *et al.* 2009; Shah *et al.* 2006).

⁸ EF-hand : domaine de liaison au calcium.

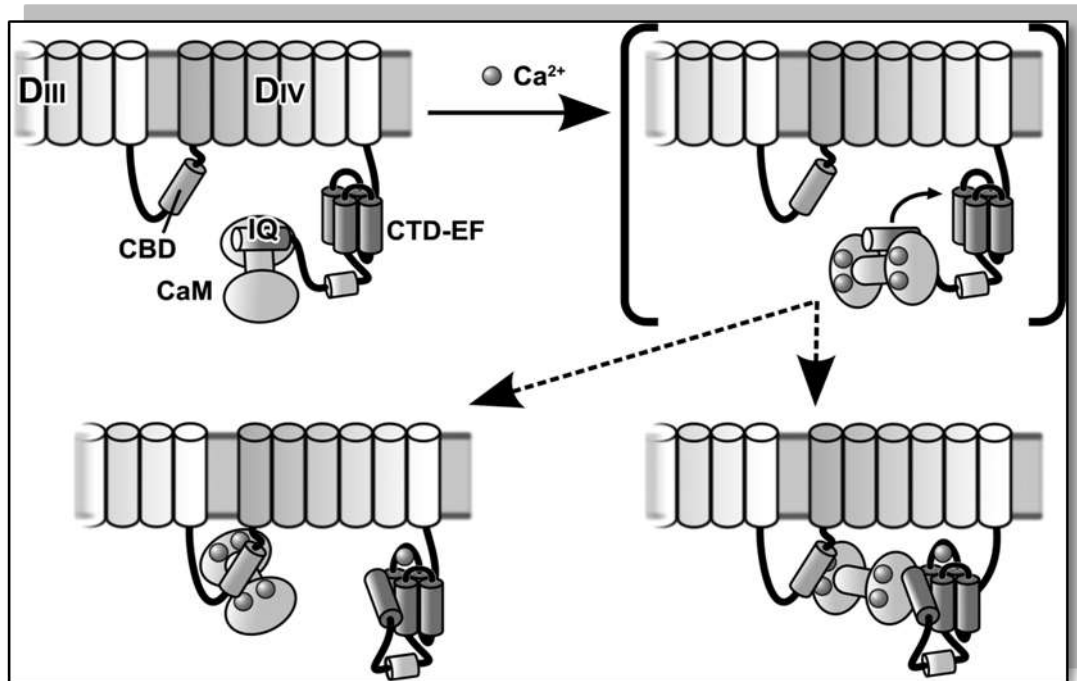


Figure 10: La calmoduline liée à l'extrémité C-terminale de Nav1.5.

L'interaction via le motif IQ est activée par le calcium intracellulaire permettant de rapprocher le domaine EF-hand du motif IQ et l'interaction avec la boucle intracytoplasmique III liant les domaines DIII-DIV (Chagot *et al.* 2009).

GPD-1L influence le trafic des canaux Nav1.5 à la membrane, mais actuellement aucune interaction directe de Nav1.5 avec GPD-1L n'est connue (Abriel 2010; Valdivia *et al.* 2009). Les mutations observées dans la protéine GPD-1L conduisent à une diminution des canaux Nav1.5 à la membrane, responsable d'un syndrome de Brugada (London *et al.* 2007). La régulation de Nav1.5 par GPD-1L semble dépendante d'une phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) (Valdivia *et al.* 2009). La GPD-1L non fonctionnelle suractiverait la PKC. Or il a été montré que la phosphorylation de la boucle des domaines DIII-DIV par la PKC, conduit à une diminution des canaux Nav1.5 à la membrane (Murray *et al.* 1997).

FHF1B est un facteur de croissance emprisonné dans le cytoplasme des cellules qui le produisent, telles que les cardiomyocytes. Deux travaux récents ont montré l'interaction de cette protéine avec l'extrémité C-terminale de Nav1.5 (Goetz *et al.* 2009; Liu *et al.* 2003). Cette interaction mime les effets de la PKA sur le canal, suggérant que FHF1B aurait un rôle de protéine d'échafaudage, ou « scaffold » (Liu *et al.* 2003). De nombreuses mutations ont été décrites dans le domaine d'interaction entre FHF1B et Nav1.5, conduisant au LQT3 ou BrS (Liu *et al.* 2003).

PTPH1 est une tyrosine phosphatase décrite pour interagir comme la syntrophine, avec le domaine PDZ situé dans la région C-terminale de Nav1.5. Le rôle des phosphorylations des

résidus tyrosine de Nav1.5 n'est pas encore bien compris. Toutefois la stabilité de l'état inactif du canal semble être sous le contrôle de la balance des tyrosines kinases, telles que Fyn, et des phosphatases PTPH1 (Abriel 2010; Jespersen *et al.* 2006).

Nav1.5 est une protéine ubiquitinylée entre autres par l'ubiquitine-ligase, **Nedd4-2** (Liu *et al.* 2003). En effet, même en absence de la ligase, la protéine Nav1.5 a été décrite ubiquitinylée par un mécanisme encore inconnu. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés qui se fixe aux protéines pour permettre leur internalisation. Les protéines internalisées sont ensuite dégradées par la voie du protéasome ou dirigées dans des vésicules de stockage intracellulaires (Abriel 2010). Nedd4-2 interagit avec le motif PY dans la région C-terminale de Nav1.5, permettant son ubiquitylation (van Bemmelen *et al.* 2004). L'ubiquitylation de Nav1.5 semblerait plus influencer le trafic du canal que sa dégradation, car après stimulation de l'ubiquitylation de Nav1.5, la quantité de protéines reste inchangée bien que le courant I_{Na} soit diminué (Rougier *et al.* 2005). Une étude récente a montré que l'inhibition du protéasome induisait une augmentation de courant I_{Na} (Kang *et al.* 2009). Ces observations suggèrent que l'ubiquitylation de Nav1.5 induit une internalisation du canal dans des vésicules de stockage, d'où les canaux ubiquitylés sont soit adressés au protéasome pour être dégradés soit désubiquitylés et recyclés à la membrane.

L'expression des protéines est aussi régulée par des petits ARNs, les microRNAs (miRNAs). Les miRNAs correspondent à un enchaînement de vingt nucléotides, décrits pour réprimer les ARNm de nombreuses protéines, dont des canaux ioniques. Les miRNAs jouent donc un rôle important dans la régulation du rythme cardiaque.

4.3 Les miRNAs

4.3.1 L'ARN interférence : un outil de régulation des protéines

Dans les années 1990, un mécanisme d'extinction de l'expression des protéines a été mis en évidence suite à l'introduction d'un transgène dans les Pétunias (Napoli *et al.* 1990). Napoli *et al.* souhaitaient intensifier la couleur pourpre des pétunias et ont pour cela utilisé la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* porteuse d'un plasmide avec le gène du pigment. Paradoxalement, ils ont obtenu des Pétunias blancs. A l'époque, les auteurs suggéraient une interaction du transgène avec le gène exogène, qui éteindrait l'expression du gène endogène (Napoli *et al.* 1990).

En 1998, Fire et Mello, reprenaient des observations des années 1980, qui montraient que l'injection d'ARN dans les cellules interfère avec la fonction des gènes (Fire *et al.* 1998). Ils ont alors mis en évidence une extinction spécifique d'un gène-cible lorsqu'ils injectaient l'ARN sous forme de doubles brins dans le ver *Caenorhabditis elegans*. Cette découverte a valu aux Docteurs Mello et Fire le prix Nobel de médecine/physiologie en 2006 (Fire *et al.* 1998).

En parallèle, des petits ARNs de 20 nucléotides, les miRNAs, exprimés temporairement ont été identifiés dans ce même ver. Le premier caractérisé, lin-4, se fixe de façon complémentaire à la séquence 3' non codante (3' UnTranslated Region, 3'UTR) de l'ARNm du gène lin-14, réprimant ainsi sa traduction (Lee *et al.* 1993).

En 2000, le second miRNA endogène, let-7, est identifié dans *Caenorhabditis elegans* (Reinhart *et al.* 2000). Ce miRNA est grandement conservé entre les espèces et est même exprimé dans les cellules humaines (Pasquinelli *et al.* 2000). Depuis sa découverte, des centaines de miRNAs ont été identifiés. A ce jour, la base de l'institut Sanger recense 1218 miRNAs chez l'Homme.

4.3.2 L'identification des miRNAs

Les premiers miRNAs ont été identifiés par génétique classique, la majorité des miRNAs sont aujourd'hui identifiés par criblage de banques de miRNAs obtenues de divers tissus ou par des outils bioinformatiques, mais pour la majorité des miRNAs identifiés aucune fonction ne leur est attribuée.

Les banques de miRNAs d'un tissu sont obtenues après isolement de ses petits ARNs et clonage des ADNc dans des vecteurs de sélection. Les ADNc clonés sont séquencés et grâce à des outils bioinformatiques, les séquences sont localisées sur le génome (Berezikov *et al.* 2006).

L'identification des miRNAs est difficile. En effet, certains miRNAs s'expriment à un stade précis du développement et sont spécifiques d'un tissu. Le criblage des banques de miRNAs est donc laborieux. Des outils informatiques de prédiction des gènes de miRNAs ont donc été mis en place pour aider à l'identification des gènes. Les prédictions informatiques se basent sur la structure des précurseurs des miRNAs repliée en épingle à cheveux ou « hairpin », la conservation phylogénétique des séquences des miRNAs, la stabilité thermodynamique des brins repliés en « hairpin » et l'homologie de séquences avec les miRNAs connus (Ambros 2004; Berezikov *et al.* 2006). L'existence des séquences ainsi identifiées doit ensuite être validée expérimentalement en s'aidant des banques de miRNAs.

Par ailleurs, les miRNAs ont la particularité d'être regroupés, de former des « clusters », sur le génome. Certains miRNAs ont ainsi pu être identifiés en étudiant la région génomique entourant les miRNAs connus (Ambros 2004; Berezikov *et al.* 2006).

Les miRNAs identifiés sont enregistrés dans une base de données, miRBase, qui regroupe les miRNAs de cinquante-huit espèces différentes (Griffiths-Jones *et al.* 2008). Nous sommes actuellement à la quinzième version de miRbase. Tous les miRNAs sont contrôlés avant leur enregistrement. Cette base compte à ce jour 780 miRNAs matures enregistrés pour la souris et 1218 chez l'Homme (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). De nombreuses séquences de miRNAs décrites pour un organisme sont des séquences homologues identifiées dans un autre organisme, mais leur expression n'a pas forcément été vérifiée dans le deuxième organisme (Griffiths-Jones *et al.* 2006). Ainsi en 2006, l'équipe de Griffiths-Jones, décrivait 313 miRNAs adultes et seulement 223 étaient expérimentalement vérifiés, les autres miRNAs sont des homologues de miRNAs identifiés (et vérifiés expérimentalement) chez le rat, la souris ou le poisson-zèbre (Griffiths-Jones *et al.* 2006). De nombreux miRNAs tels que miR-574-3p, mais aussi miR-720 ont une séquence identifiée mais n'ont aucune cible répertoriée.

4.3.3 La biogénèse et la fonction des miRNAs

La majorité des séquences codantes des miRNAs sont constituées de régions intergéniques ou, lorsqu'elles sont intragéniques, de régions antiparallèles aux séquences codantes des gènes ciblés. La majorité des gènes des miRNAs sont situés dans des zones intergéniques ou dans l'orientation antisens des gènes annotés et certains miRNAs sont localisés dans les régions introniques (Lee *et al.* 2004). Ils résultent de l'expression d'un long ARNm précurseur (voir Figure 11) qui est clivé en un petit brin d'ARN de dix-huit à vingt-cinq nucléotides non codants se liant :

- soit avec une complémentarité parfaite dans la partie 3'UTR de l'ARNm cible, produisant sa dégradation (processus observé majoritairement chez les plantes) :
- soit avec une complémentarité partielle, qui permet de réprimer la traduction (Pillai *et al.* 2007).

Bien que la complémentarité parfaite semble être un élément essentiel pour la dégradation des ARNm cibles, il paraît de plus en plus évident, qu'une complémentarité partielle peut aussi conduire à une dégradation de l'ARNm (Lim *et al.* 2005).

L'appariement des miRNAs avec leurs ARNm cibles est encore mal compris. Plus l'appariement est parfait, plus la répression de l'ARNm est optimisée. L'appariement des miRNAs avec leurs ARNm cibles était décrit pour être assuré par le « seed site », défini par une complémentarité parfaite de sept ou huit nucléotides, à partir de la première ou de la deuxième base de la partie 5' du miRNA avec la région cible, en 3'UTR de l'ARNm réprimé (Doench et Sharp 2004; Lewis *et al.* 2003; Watanabe *et al.* 2007). Lorsque l'appariement en 5' du miRNA est assuré par moins de nucléotides il peut être renforcé par un appariement complémentaire de nucléotides en 3' du miRNA avec l'ARNm cible (Watanabe *et al.* 2007). Plus rarement, les miRNAs peuvent aussi se lier à leurs ARNm cibles par les nucléotides centraux de leurs séquences. Toutefois, il semblerait que cet appariement soit moins stable et donc moins efficace dans la répression de l'ARNm cible (Shin *et al.* 2010; Watanabe *et al.* 2007) (Figure 12). L'équipe de Doench montrait aussi en 2003 que plus le nombre de sites de fixation d'un miRNA sur un ARNm cible est important plus la répression de l'ARNm est assurée (Doench *et al.* 2003). Toutefois des travaux ont montré que la fixation d'un miRNA sur un seul site pouvait suffire à réprimer la traduction de certains ARNm cibles, dont miR-1 et miR-133a qui répriment l'expression de HCN2 par fixation sur un seul site (Xiao *et al.* 2007). Plusieurs miRNAs peuvent

cibler le même ARNm cible et il semblerait qu'ils pourraient avoir un effet coopératif (Krek *et al.* 2005; Sætrom *et al.* 2007).

Récemment, les miRNAs ont été décrits pour cibler la partie 5'UTR des ARNm, il semblerait que les miRNAs pourraient aussi s'apparier sur toute la séquence des ARNm. (Lytle *et al.* 2007; Kloosterman *et al.* 2004). La découverte des miRNAs est relativement récente et leur mode de fonctionnement semble très complexe.

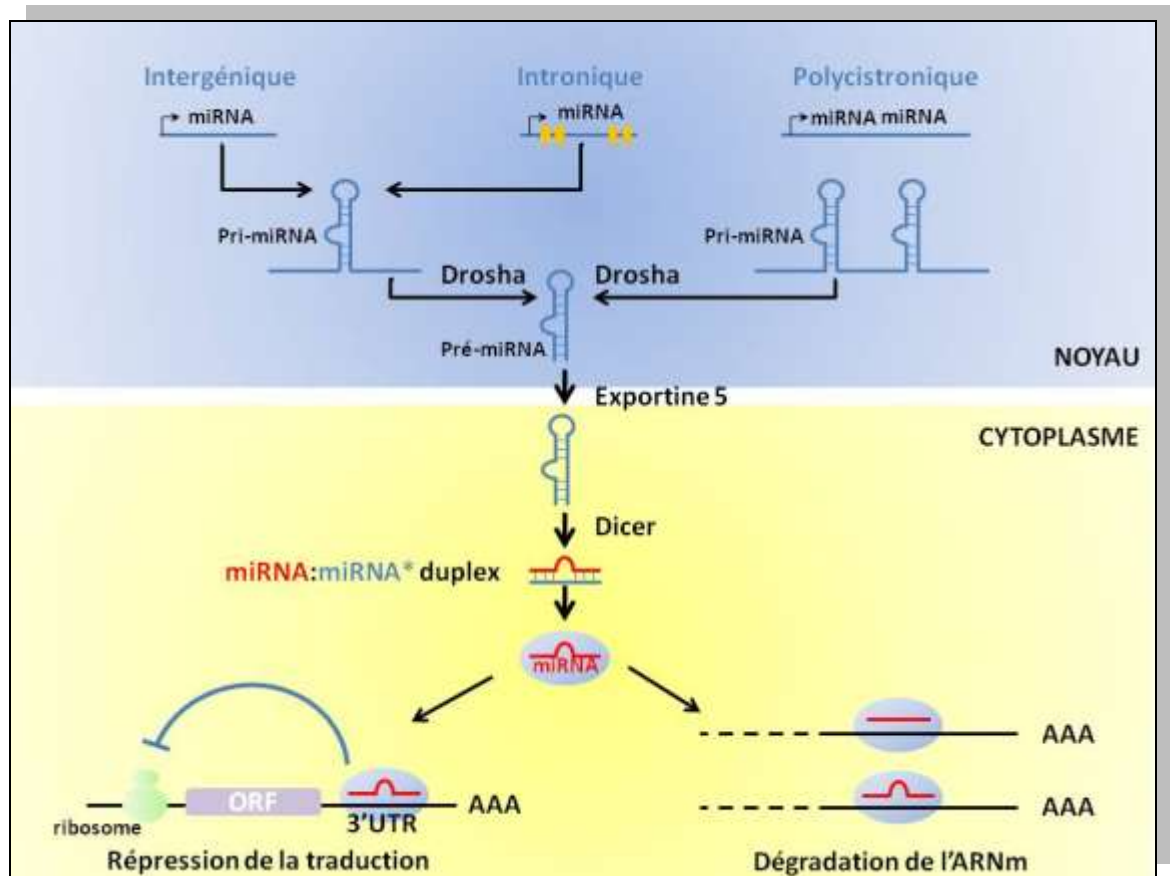


Figure 11 : Biogénèse et fonction des miRNAs.

Les transcrits primaires des miRNAs, pri-miRNAs, sont transcrits par une polymérase de type II à partir de gènes individuels, ou d'introns de gènes de protéines codantes, ou de transcrits polycistroniques. La polymérase de type III, Droscha, clive ces pri-miRNAs en précurseurs en forme de tête d'épingle de 70-100 nucléotides, appelés pré-miRNAs. Les pré-miRNAs sont exportés dans le cytoplasme grâce à l'exportine 5. Dans le cytoplasme les pré-miRNAs sont clivés par la polymérase de type III, Dicer, en deux brins de vingt-deux nucléotides. La protéine RISC, prend en charge un des deux brins, le brin mature. Le complexe RISC-miRNA se fixe sur la partie 3'UTR des ARNm cibles. Si la reconnaissance est parfaite, l'ARNm cible est dégradé. Si la complémentarité n'est que partielle, la traduction de l'ARNm est réprimée. Le deuxième brin, miRNA*, libéré dans le cytoplasme est rapidement dégradé (van Rooij et Olson 2007).

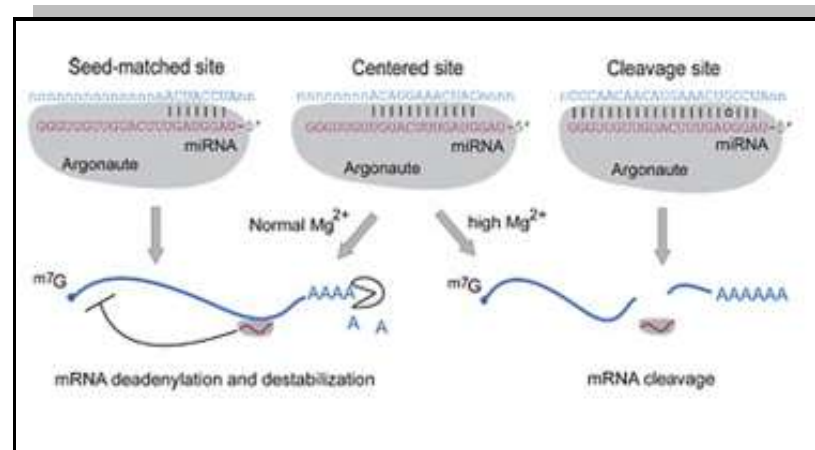


Figure 12 : les différents modes d'appariements des miRNAs sur leurs ARNm cibles. (Shin *et al.* 2010)

Les miRNAs réguleraient environ 30 % du génome humain et chaque miRNA possède plusieurs cibles potentielles (Lewis *et al.* 2005). Ils permettent ainsi de réguler de nombreuses voies, telles que le contrôle du développement, l'apoptose, la différenciation des cellules hématopoïétiques, le développement des organes... (Bartel 2004)

4.3.4 Les miRNAs dans le cœur

Les miRNAs permettent aussi de réguler spécifiquement les protéines au sein de chaque tissu. Ils ont en effet une répartition tissu-spécifique qui évolue au cours du développement (Lagos-Quintana *et al.* 2002; Lim *et al.* 2005). Selon une étude de 2007 criblant 428 miRNAs, 87 ont été confirmés pour être exprimés dans le cœur adulte, dont miR-1, le miRNA majoritaire dans le cœur, représente 45 % des miRNAs totaux exprimés dans le cœur (Ikeda *et al.* 2007 ; Lagos-Quintana *et al.* 2002).

MiR-1, miR-133, miR-206 et miR-208 sont majoritairement exprimés dans le cœur. Cependant, seul miR-208 est spécifique au cœur, car son gène est situé dans un intron de la chaîne lourde de la myosine α (Callis *et al.* 2009). L'expression de miR-1 et miR-133 est spécifique aux muscles. Deux gènes situés sur les chromosomes 2 et 18 expriment miR-1 et miR-133. Ces deux gènes, régulés de la même façon, codent l'expression de ces deux miRNAs à partir d'un seul transcrit. L'expression de ces deux miRNAs augmente au cours du temps (Chen *et al.* 2006) . Ce sont des miRNAs essentiels au développement des cellules musculaires.

MiR-1 promeut entre autres la différenciation cellulaire, augmente la synthèse du facteur de transcription Mef-2d, ainsi que les facteurs de réponses au sérum, (Serum Response Factor, SRFs). Ces facteurs sont aussi connus pour activer la transcription de miR-1 et miR-133,

aux deux locus (Chen *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2005). En revanche miR-133 active la prolifération cellulaire, contrairement à miR-1, et réprime les SRFs. Ces deux miRNAs, issus des mêmes transcrits, ont des cibles différentes voire même antagonistes (Chen *et al.* 2006). Ces deux miRNAs sont essentiels dans la régulation du développement du cœur.

Lorsque l'expression de ces miRNAs est modifiée, le développement cardiaque est perturbé. Une sous-expression de miR-133 et de miR-1 est caractéristique des cœurs hypertrophiques (Ikeda *et al.* 2007). Ils jouent aussi un rôle fondamental dans la régulation du rythme cardiaque. Plusieurs travaux ont en effet montré que ces miRNAs ciblent des canaux ioniques.

Les miRNAs et les cardiopathies

Dans le cœur de rat infarci, une augmentation de miR-1 a été observée (Yang *et al.* 2007). L'injection de miR-1 dans des cœurs normaux provoque un ralentissement de la conduction et une dépolarisation des cardiomyocytes. Ces observations montrent un rôle important de miR-1 dans la régulation du rythme cardiaque (Yang *et al.* 2007). Il a été observé dans ces cœurs une diminution de l'expression des protéines des jonctions communicantes, en particulier des Connexines 43(Cx-43), et du canal potassique, Kir2.1 (Yang *et al.* 2007). Les ARNm de ces 2 protéines sont des cibles de miR-1 (Yang *et al.* 2007). MiR-1 contrôle la conduction cardiaque par répression de la Cx-43, de Kir2.1 mais aussi de la sous-unité régulatrice, KCNE1, du canal potassique KCNQ1. Ce canal est lui-même réprimé par miR-133 qui régule aussi le canal Herg (Luo *et al.* 2007).

La régulation de Herg par les miRNAs a été observée en comparant des patients diabétiques, souffrant de QT long suite à une sous-expression de Herg. Ces patients ont un taux cardiaque plus élevé de miR-1 et miR-133 (Xiao *et al.* 2007). Cette observation suggère que les miRNAs peuvent être utilisés comme des marqueurs biologiques pour certains syndromes cardiaques tels que le QT long. Toutefois, ces miRNAs régulent de nombreuses protéines impliquées dans différentes voies. Il paraît donc difficile de cibler ces miRNAs pour un traitement pharmacologique du QT long.

Xiao *et al.* ont proposé la mise en place d'un pacemaker biologique en s'appuyant sur la régulation de HCN2 et HCN4 (les canaux pacemakers) par miR-1 et miR-133 (Xiao *et al.* 2007). HCN2 est réprimé par miR-133 et miR-1 et HCN4 uniquement par miR-1. La répression de ces canaux pacemaker par miR-1 et miR-133, explique la diminution du nombre de ces canaux au cours du développement. En revanche, ces canaux sont réexprimés dans le développement de

l'hypertrophie (où ces miRNAs sont sous-régulés) (Luo *et al.* 2008). En s'appuyant sur ces découvertes, Xiao *et al.* ont utilisé des anti-miRNAs synthétiques de miR-1 et miR-133, basés sur la séquence cible en 3'UTR de HCN2 et HCN4. Ils ont alors observé une augmentation de canaux HCN2/HCN4 fonctionnels dans des cardiomyocytes en culture (Xiao *et al.* 2007). Ils ont aussi réalisé le même travail avec des miRNAs synthétiques mimant miR-1 et miR-133. Une diminution des canaux HCN2/HCN4 était observée. Cependant, on ne sait pas comment ces miRNAs synthétiques ciblent les autres ARNm cibles des miRNAs naturels qu'ils miment (Xiao *et al.* 2007). La spécificité est encore à démontrer.

Récemment, une étude réalisée sur des souris invalidées pour miR-208, le miRNA spécifique au cœur, montrait une diminution importante de la connexine 40, protéine des jonctions gap. Ce miRNA aurait donc un rôle dans la régulation de la conduction cardiaque, qu'il reste encore à établir (Callis *et al.* 2009).

La régulation des miRNAs semble très sensible. Une sur-expression de miR-1 provoque des troubles du rythme alors qu'une sous-expression de ce miRNA conduit à une hypertrophie cardiaque (Anderson et Mohler 2007; Yang *et al.* 2007).

L'étude de ces miRNAs dans le système cardiovasculaire est donc importante. Ils régulent en effet de nombreux processus cellulaires dont la conduction cardiaque mais aussi la fibrose.

Les miRNAs dans la fibrose cardiaque

La fibrose est caractérisée par une accumulation de protéines dans la matrice extracellulaire, dont principalement du collagène. Elle est consécutive à un stress, à des troubles cardiaques (Jiang *et al.* 2010). Une étude remarquable de Thum et ses collaborateurs (Thum *et al.* 2008) a montré que miR-21 est sur-exprimé lors de l'apparition de la fibrose dans un modèle d'hypertrophie cardiaque chez la souris. Il est plus particulièrement sur-exprimé dans les fibroblastes où il régule la voie des MAP Kinases en favorisant la survie des fibroblastes. Dans cette étude, Thum *et al.* Parviennent à prévenir et à traiter la fibrose en injectant l'antagomir de miR-21 (l'antagomir est la séquence antagoniste au miRNA) (Thum *et al.* 2008). La sous-expression de miR-133 et miR-30 est aussi observée dans les cœurs hypertrophiés. Ces deux miRNAs sont décrits pour réguler un facteur de croissance pro-fibrotique : le facteur de croissance des tissus de connexion (Connective Tissue Growth Factor, CTGF). Ainsi, leur régulation négative dans l'hypertrophie favorise l'expression de ce facteur, permettant la synthèse de collagène (Duisters *et al.* 2009). Un autre miRNA est décrit pour être important dans

la fibrose, miR-29. Ce miRNA est fortement sous-régulé, par un mécanisme non encore établi qui semblerait faire intervenir la voie du TGF- β (Transforming Growth Factor). Ce miRNA est décrit pour cibler de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène. Sa sous-expression dans l'hypertrophie favorise donc l'expression de ces protéines de la matrice (Jiang *et al.* 2010; van Rooij *et al.* 2008).

OBJECTIFS DE LA THESE :

Au cours de ma thèse j'ai travaillé sur un modèle de souris KO hétérozygotes pour le gène *Scn5a*, *Scn5a*^{+/-}. Ces souris ont la particularité de développer au sein d'une même portée des troubles de la conduction plus ou moins sévères.

- La moitié de ces souris transgéniques ont de forts troubles de la conduction associés avec le développement d'une fibrose dans le ventricule gauche. Ces souris *Scn5a*^{+/-} ont un phénotype « sévère ».
- L'autre moitié de la population, peu ou pas touchée par les troubles de la conduction n'a aucune fibrose.

Une différence majeure entre les deux phénotypes (sévère ou mineur) est le niveau d'expression cardiaque de Nav1.5. En effet, bien que toutes les souris *Scn5a*^{+/-} expriment 50% de l'ARNm de Nav1.5 par rapport aux souris sauvages, seules les souris avec des troubles sévères de la conduction n'expriment plus que 50% de la protéine Nav1.5 par rapport aux souris sauvages. Les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur », expriment 75% de la protéine Nav1.5 (Leoni *et al.* 2010).

L'expression des autres canaux ioniques impliqués dans la conduction cardiaque, n'est pas modifiée. La différence des troubles ioniques observée entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » et celles avec un phénotype « mineur » semble directement liée à la différence d'expression de Nav1.5 entre les deux types de souris (Leoni *et al.* 2010).

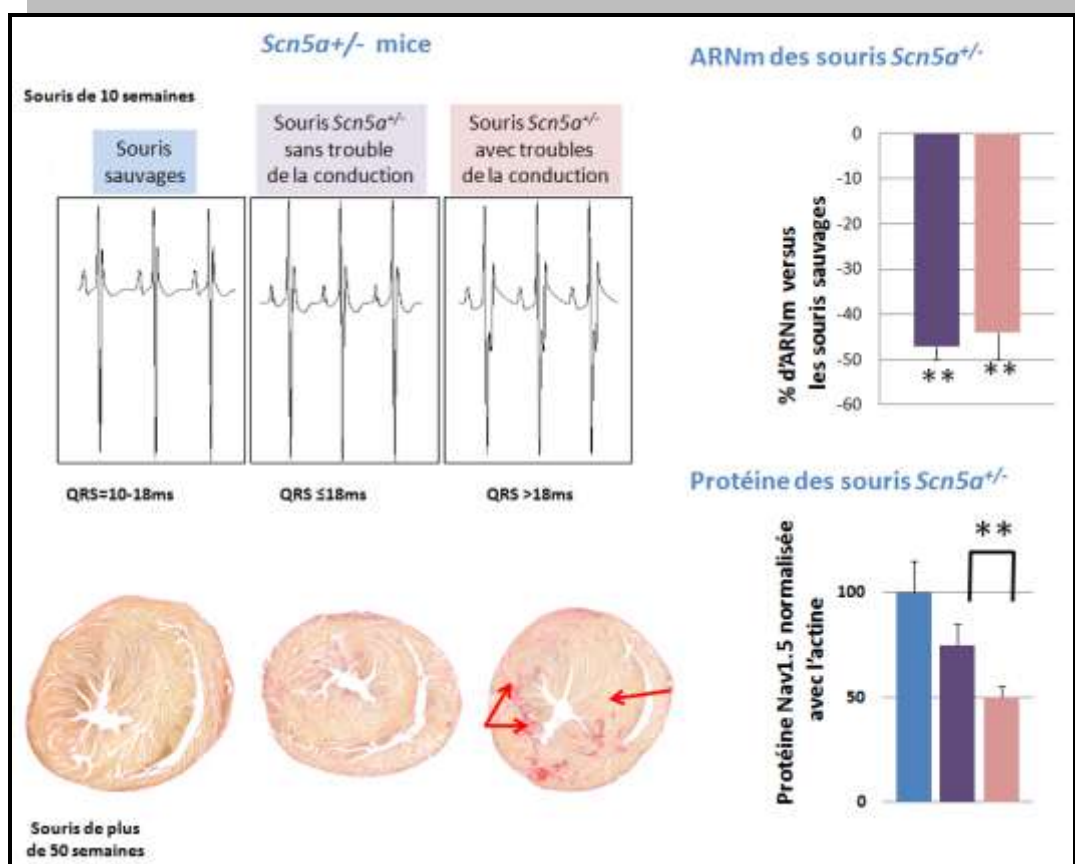


Figure 13: Descriptif des souris *Scn5a*^{+/-}.

Les ECGs montrent un allongement des complexes QRS dans la moitié des souris *Scn5a*^{+/-} caractéristique des troubles de la conduction. Les coupes histologiques montrent la fibrose des souris avec des troubles de la conduction (flèches rouges). Le graphe en haut à droite montre que les souris transgéniques expriment 50% d'ARNm mais seules les souris avec des troubles de la conduction ont 50% de protéines Nav1.5, les autres souris transgéniques expriment 75% de la protéine Nav1.5 (graphe en bas à droite).

Afin d'éclaircir ce phénotype des souris KO hétérozygotes pour Nav1.5, nous avons posé deux questions :

- Nous avons voulu mieux comprendre la régulation de Nav1.5, son trafic, sa stabilisation à la membrane des cardiomyocytes et sa dégradation. Comment ces protéines partenaires influencent le canal ?
- Pour expliquer cette différence nous avons étudié les miRNAs de ces souris afin d'identifier un ou des miRNA(s) régulant directement Nav1.5 ou une de ses protéines régulatrices dans l'espoir d'identifier un nouveau marqueur des troubles de la conduction qui pourrait être utilisé comme nouvelle cible thérapeutique. Un miRNA participe-t-il aux troubles de la conduction des souris KO hétérozygotes pour le gène *Scn5a* (*Scn5a*^{+/-}) ?

ETUDE DU CANAL NAV1.5

1. Résultats

Pour tenter d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la différence de phénotype des souris *Scn5a^{+/-}*, nous avons développé deux axes de recherche.

- L'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'expression et du trafic de Nav1.5 en faisant appel à des méthodes de biochimie et de biologie cellulaire.
- La recherche de facteurs pouvant moduler l'expression de Nav1.5 et en particulier le rôle des miRNAs.

La stratégie expérimentale et le choix du matériel d'étude se sont bien entendu rapidement posés. Autant l'utilisation des cœurs de souris *Scn5a^{+/-}* était un choix évident pour identifier les miRNAs potentiellement intéressants, autant leur utilisation dans des approches de biochimie posait plus de questions. Nous voulions travailler sur les cardiomyocytes isolés de ces souris. La quantité de matériel disponible: tant le nombre de souris à élever que le nombre de cardiomyocytes isolés, ensemencés et demeurant viables pouvait limiter mon étude. Ces notions expliquent notamment pourquoi la majorité des études réalisées sur Nav1.5, ont été faites dans des systèmes de réexpression et que très peu de données sont établies sur la régulation de Nav1.5 dans les cardiomyocytes.

Quoiqu'il en soit, nous avons cherché à mettre au point les expériences sur différents modèles: des cardiomyocytes de souris adultes isolés et maintenus en culture, des cardiomyocytes de souriceaux et de rats nouveau-nés en culture et un système de réexpression (cellules HEK transfectées de façon stable avec Nav1.5). J'ai résumé dans les paragraphes suivants ce travail de mise au point et les résultats nouveaux sur les mécanismes cellulaires d'expression de Nav1.5 que j'ai obtenus.

1.1 Choix du modèle cellulaire approprié: cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés.

Notre premier objectif a été de comprendre la différence de phénotype entre les deux populations de souris transgéniques *Scn5a^{+/-}*. Nous avons donc étudié la protéine dans les cardiomyocytes adultes de souris. Pour cela, nous nous sommes inspirés du protocole mis au point par une équipe américaine, qui permet l'isolement de un million de cardiomyocytes par cœur de souris adulte et de les maintenir en culture soixante-douze heures. (O'Connell *et al.* 2007)

Après différentes mises au point nous avons pu ainsi isoler et mettre en culture en moyenne 800 000 cardiomyocytes viables par cœur. En plus de l'exclusion de colorant vital (bleu trypan) nous avons utilisé quelques critères morphologiques pour qualifier une « bonne » préparation des cardiomyocytes. Notamment, les cellules doivent être réfringentes lors de l'observation au microscope, les cardiomyocytes doivent se présenter comme des bâtonnets dont les extrémités correspondant aux disques intercalaires sont « carrées » et surtout pas arrondies et sans contraction spontanée (Figure 14).

Autant cette étape d'isolement s'est avérée reproductible autant le maintien des cardiomyocytes en culture s'est avéré très délicat. Comme cela est indiqué sur la Figure 14A la survie des cellules en culture est extrêmement limitée. 40% des cardiomyocytes meurent dans l'heure qui suit la mise en culture et seuls 20 % survivent après quarante-huit heures.

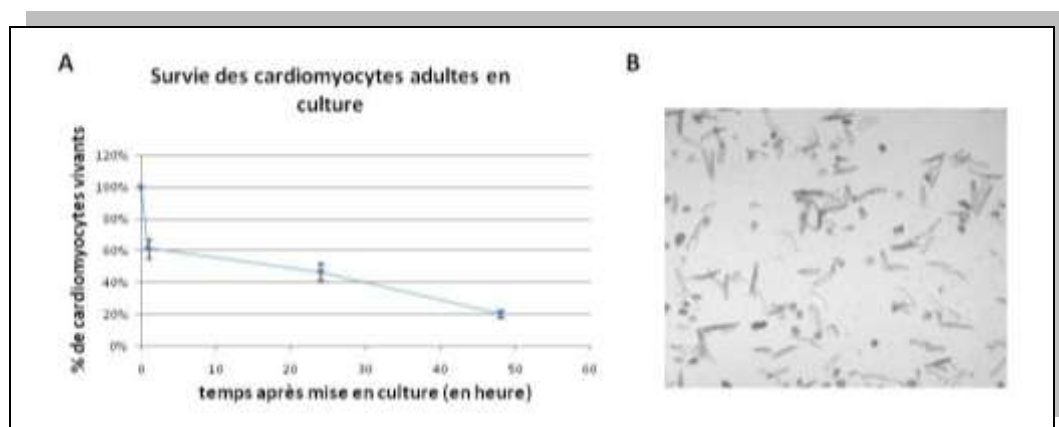


Figure 14 : Isolement et survie des cardiomyocytes de souris en culture.

- A) 40 % des cardiomyocytes ne résistent pas à l'ensemencement et au bout de quarante-huit heures il ne reste que 20 % des cardiomyocytes ensemencés. Les données en pourcentage correspondent au nombre de cardiomyocytes présents au cours du temps par rapport au nombre de cardiomyocytes initialement ensemencés. Les points sont les valeurs moyennées \pm sem de cinq isollements différents.
- B) Cardiomyocytes adultes isolés de cœurs de souris, une heure après ensemencement et après rinçage.

Il ressort donc que, comme c'est de notoriété, « dans mes mains » la culture de cardiomyocytes de souris adultes reste une technique très délicate qui ne me permettait pas d'envisager leur utilisation dans des expériences de biochimie, où nous aurions eu besoin de beaucoup de cellules pour avoir assez de protéines.

Aussi, nous sommes-nous orientés vers la technique d'isolement et de culture de cardiomyocytes de souriceaux nouveau-nés. Nous arrivons à isoler dix à douze millions de cardiomyocytes à partir de dix-huit souriceaux âgés de un à quatre jours et à les maintenir trois jours en culture. Ce modèle nous semblait intéressant pour pouvoir étudier le canal Nav1.5. Cependant la variabilité du nombre de souriceaux nés des souris gestantes nous obligeait à surévaluer leur nombre ce qui constituait un coût important. Aussi, nous avons pensé qu'il serait préférable de travailler sur des cardiomyocytes nouveau-nés de rats. Le même nombre de cardiomyocytes pouvant être obtenu mais à partir de seulement sept rats.

Comme cela est illustré sur la Figure 15, les cardiomyocytes de rats en culture primaire constituent un modèle intéressant pour étudier Nav1.5. Nav1.5 est fortement exprimé dans ces cellules puisque la protéine peut être facilement détectée dans seulement 8 µg de protéines en Western blot (figure 15A). Des expériences d'immuno-localisation montrent un marquage diffus autour du noyau des cellules qui correspond probablement à un compartiment Golgien des cardiomyocytes. Un marquage plus défini correspondant probablement à une localisation membranaire est également visible au bord des cellules (flèches).

Enfin, pour l'étude fondamentale du canal Nav1.5, nous avons travaillé avec des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés. Les résultats obtenus pourront être ultérieurement exploités pour l'étude des souris *Scn5a*^{+/-}.

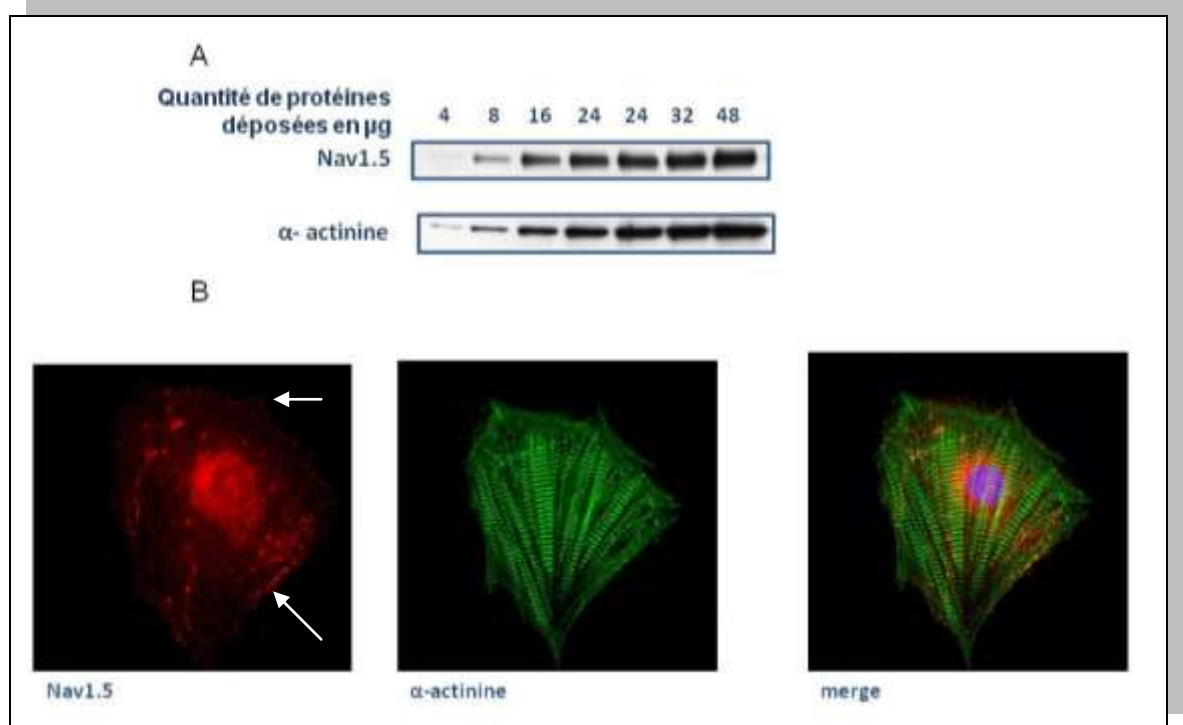


Figure 15 : Expression de Nav1.5 dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture.

- A) Des quantités croissantes de protéines ont été déposées, puis révélées avec l'anticorps anti-Nav1.5 ou l'anti- α -actinine. Un signal est perceptible à 4 μ g de protéine et est clairement détecté sur un dépôt de 8 μ g de protéine.
- B) Ces immunofluorescences montrent l'expression diffuse de Nav1.5, en rouge et de l' α -actinine, en vert, dans des cardiomyocytes isolés en culture.

1.2 Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les cardiomyocytes

Après avoir déterminé notre modèle d'étude, nous voulions définir le temps de synthèse de la protéine Nav1.5 dans les cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés. Afin de réaliser ce travail, nous avons mis au point la technique du « pulse chase » radioactif dans ces cellules.

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la spécificité des expériences d'immunoprécipitation de Nav1.5 (IP-Nav1.5). Pour cela, les IP-Nav1.5 sont confrontées à des immunoprécipitations contrôles réalisées avec des immunoglobulines de lapin (IP-Igg de lapin) ou des immunoglobulines de souris (IP-Igg de souris) en fonction de l'anticorps ayant servi à réaliser les IP-Nav1.5 (l'anticorps anti-Nav1.5 est produit chez le lapin ou l'anti-Nav-Pan chez la souris).

Pour ce faire, des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés ont été incubés avec un milieu contenant 250 μ Ci de méthionine et cystéine radiomarquées avec du ^{35}S pendant quinze minutes, trente minutes, une heure. La Figure 16 montre les résultats de deux expériences réalisées avec l'anti-Nav1.5 et l'anti-NavPan. Un signal correspondant au PM de Nav1.5 est

déecté dans l'IP-NavPan (Figure 16A) et l'IP-Nav1.5 (figure 16B). Malheureusement, des résultats similaires sont aussi obtenus avec les Igg contrôles de souris et de lapin respectivement. Malgré nos essais pour limiter cette contamination (en variant les quantités d'anticorps, la force ionique des tampons de rinçage, les temps d'incubation etc...) elle était toujours présente et avec des intensités différentes d'une manipulation à une autre et quel que soit l'anticorps utilisé (Figure 16 A et B).

Le manque de spécificité des protéines immunoprécipitées limite l'utilisation des expériences de « pulse chase » dans l'étude de Nav1.5 dans les cardiomyocytes. Des travaux de spectrométrie de masse réalisés au laboratoire sur un autre projet indiquent que la myosine, protéine de 223 kDa, très abondante dans les cardiomyocytes, est probablement à l'origine de cette contamination.

La technique de « pulse chase » radioactif n'est donc pas envisageable pour étudier la synthèse de Nav1.5 dans les cardiomyocytes. Je me suis alors orientée vers un modèle de réexpression in vitro.

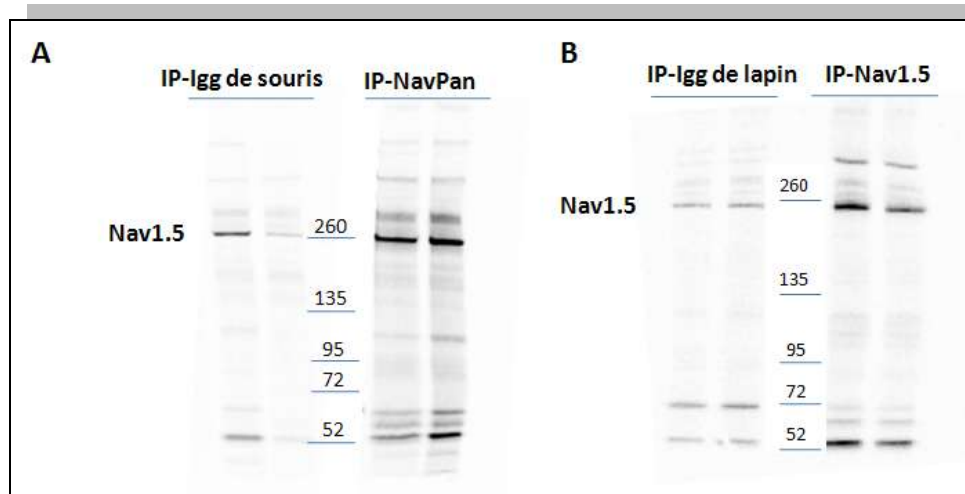


Figure 16: Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les cardiomyocytes

Des cardiomyocytes néonataux de rats ont été incubés avec un milieu enrichi en cystéine et méthionine marquées avec l'isotope ^{35}S (une heure_250 μCi en A et B). Les protéines Nav1.5 néosynthétisées sont immunoprécipitées avec des billes de protéine G coatées avec un anticorps produit chez la souris dirigé contre les canaux Nav (IP-NavPan) ou avec un anticorps contrôle de souris (IP-Igg de souris) (A) ou avec des billes de protéine A coatées avec un anticorps produit chez le lapin dirigé contre Nav1.5 (IP-Nav1.5). Les révélations autoradiographiques montrent des signaux au poids moléculaire de Nav1.5 (260 kDa) dans l'IP Nav1.5, l'IP-NavPan et les IP- contrôles des cardiomyocytes.

1.3 Etude de la biosynthèse de Nav1.5 dans les HEK-Nav1.5

Compte tenu des résultats précédents, le « pulse chase » radioactif n'est pas utilisable dans les cardiomyocytes pour l'étude de Nav1.5. Nous nous sommes alors orientés vers un système de réexpression : une lignée de HEK exprimant de façon stable Nav1.5. Dans ces cellules, nous arrivons à détecter spécifiquement les canaux Nav1.5 néosynthétisés radioactivement sans observer de contamination dans les immunoprécipitations contrôles (Figure 17A). Le niveau d'expression élevé de Nav1.5 dans ce modèle nous a permis de diminuer le temps de pulse à quinze minutes et de n'utiliser que 50 μCi de radioactivité.

Afin de suivre la dégradation de Nav1.5 dans ces cellules, nous avons réalisé une chasse des protéines radioactives néosynthétisées dans un milieu non radioactif, pendant six heures. La Figure 17B, montre une décroissance continue des protéines Nav1.5 néosynthétisées au cours des quatre premières heures de chasse. Seuls $44 \pm 3\%$ ($n=5$) des canaux Nav1.5 néosynthétisés sont encore présents après quatre heures de chasse. Cependant, ce taux d'expression se maintient jusqu'à six heures de chasse.

Nous avons donc pu déterminer dans les HEK un temps de demi-vie de $3\text{h}43 \pm 30$ minutes pour l'ensemble des canaux Nav1.5 néosynthétisés en quinze minutes.

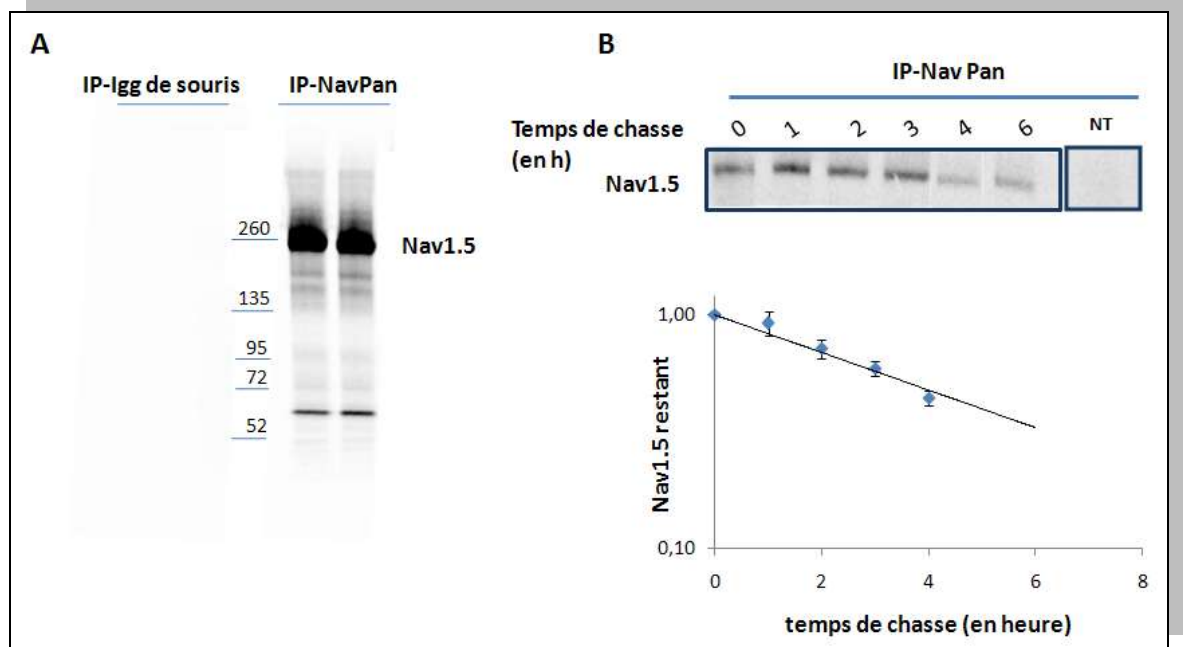


Figure 17: Détermination de la demi-vie de Nav1.5 dans des HEK.

Des cellules HEK ont été incubées avec un milieu enrichi en cystéine et méthionine marquées avec l'isotope ^{35}S (une heure $_{250}\ \mu\text{Ci}$ en A, quinze minutes $_{50}\ \mu\text{Ci}$ en B).

- A)** Les protéines Nav1.5 néosynthétisées sont immunoprécipitées avec des billes de protéine G coatées avec un anticorps produit chez la souris dirigé contre les canaux Nav (IP-NavPan) ou avec un anticorps contrôle de souris (IP-IgG de souris). Les révélations autoradiographiques montrent des signaux au poids moléculaire de Nav1.5 (260 kDa) uniquement dans l'IP-NavPan, aucun signal n'est présent dans les IP- contrôles.
- B)** Les protéines Nav1.5 synthétisées au cours de quinze minutes de pulse radioactif, sont chassées pendant zéro, une, deux, trois, quatre et six heures dans un milieu non radioactif. L'absence de signal dans les HEK non transfectées (NT) montre la spécificité du signal pour Nav1.5. Les données sont exprimées en pourcentage de Nav1.5 mesuré au temps t_0 en fonction de la quantité de Nav1.5 synthétisée en t_0 . Les données sont présentées sur une échelle logarithmique. Chaque point correspond à la valeur moyennée \pm sem d'au moins cinq expériences distinctes.

1.4 La sous-unité Bêta 1 ne modifie pas la demi-vie de Nav1.5

Plusieurs études montrent que la sous-unité régulatrice $\beta 1$ augmente la densité de Nav1.5 à la membrane plasmique des cellules (Qu *et al.* 1995; Watanabe *et al.* 2008; Zimmer *et al.* 2002; Zimmer et Benndorf 2002). En revanche, il n'est pas encore clairement précisé comment la sous-unité participe à cette augmentation. Elle pourrait influencer la synthèse de canaux Nav1.5 en limitant la dégradation des canaux, d'autant que l'association Nav1.5- $\beta 1$ a lieu dans le RE et pourrait donc protéger les canaux synthétisés de la dégradation lors du contrôle qualité du RE (Zimmer *et al.* 2002).

Nous avons étudié l'implication de la sous-unité $\beta 1$ sur la demi-vie de Nav1.5, en réalisant un « pulse chase » sur des cellules HEK-Nav1.5, transfectées avec les plasmides codants pour la sous-unité $\beta 1$ ou une protéine membranaire de type I (comme la sous-unité $\beta 1$) contrôle, la protéine CD4.

Comme l'illustre la Figure 18, la sous-unité $\beta 1$ ne modifie pas significativement la demi-vie de la protéine Nav1.5 (test Mann et Whitney). Dans les cellules exprimant la sous-unité $\beta 1$, Nav1.5 a une demi-vie de $3h20 \pm$ vingt minutes.

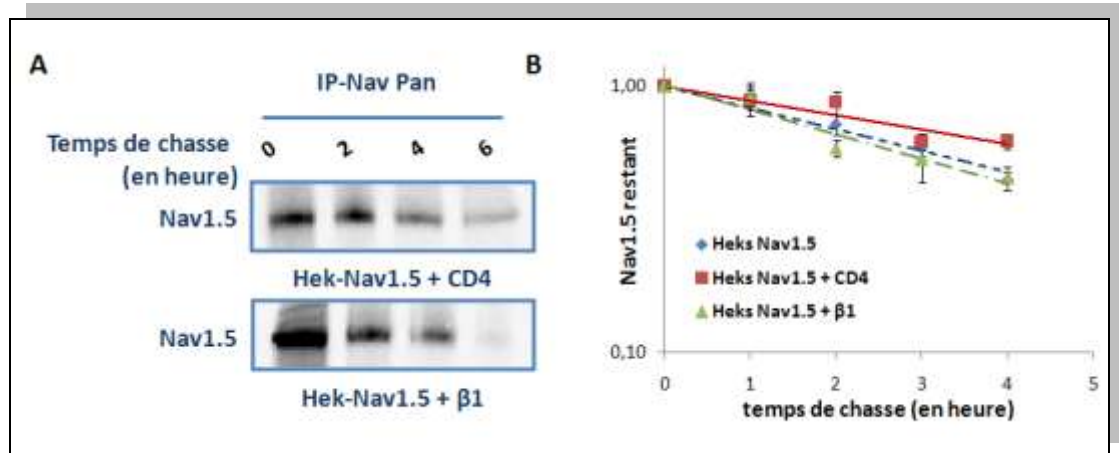


Figure 18: La sous-unité $\beta 1$ ne modifie pas la demi-vie de Nav1.5.

- A)** Les cellules HEK-Nav1.5 exprimant le plasmide contrôle CD4 ou le plasmide $\beta 1$, sont incubées quinze minutes avec un milieu radioactif. Les protéines Nav1.5 néosynthétisées au cours du pulse sont immunoprécipitées après zéro, deux, quatre et six heures de chase dans un milieu froid. Dans cette expérience un signal de synthèse plus important dans les cellules transfectées avec la sous-unité $\beta 1$ par rapport à celles transfectées avec CD4 est observé. Toutefois cette différence n'est pas significative, elle varie de $150 \% \pm 53\%$ ($n=7$), non significatif par test de Mann et Withney au seuil de 5 %.
- B)** Les données sont exprimées en pourcentage de Nav1.5 mesuré au temps t en fonction de la quantité de Nav1.5 synthétisée en t_0 . Les données sont présentées sur une échelle logarithmique. Chaque point correspond à la valeur moyennée \pm sem d'au moins cinq expériences distinctes.

Nous avons étudié la demi-vie de Nav1.5 dans les cellules HEK-Nav1.5, car nous ne parvenions pas à obtenir une immunoprécipitation radioactive spécifique de Nav1.5 dans les cardiomyocytes. Toutefois, maîtrisant la culture des cardiomyocytes néonataux de rats, nous avons entrepris d'étudier l'expression membranaire de Nav1.5 dans ces cellules. Les cardiomyocytes en culture présentent l'avantage d'exprimer toutes les protéines partenaires de Nav1.5 et représentent un système plus physiologique que les HEK-Nav1.5.

1.5 L'expression membranaire de Nav1.5 dans les cardiomyocytes est stable.

Tout d'abord, pour quantifier l'expression et l'évolution des canaux Nav1.5 localisés à la membrane plasmique des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, nous avons développé une technique de biotinylation. Pour cela, les protéines membranaires des cardiomyocytes sont marquées pendant quinze minutes avec une biotine imperméante. Les protéines membranaires biotinylées sont alors précipitées spécifiquement, grâce à des billes recouvertes de streptavidine, après zéro, quatre, huit, vingt-quatre et trente heures de chasse. Nous nous assurons de l'isolement spécifique des protéines membranaires dans les éluats des billes de streptavidine en utilisant une protéine cytoplasmique comme contrôle, la protéine Hsp70 («Heat Shock Protein», de 70 kDa). L'Hsp70 est une petite protéine chaperonne de 70 kDa qui participe à la maturation des protéines dans le cytoplasme. De la même façon, pour s'assurer de la biotinylation, nous utilisons un contrôle positif: le récepteur à la transferrine, TfnR. Le TfnR est une protéine membranaire peu exprimée dans les cardiomyocytes. Néanmoins, la technique mise au point permet de facilement détecter le TfnR dans les éluats des billes de streptavidine (Figure 19).

La Figure 19 A montre bien une biotinylation spécifique des protéines membranaires Nav1.5 et TfnR, mais pas de la Hsp70, dans les fractions précipitées par la streptavidine. Pendant la période de chasse, ces deux protéines membranaires suivent le même profil d'expression. Après quatre heures de marquage, $100 \pm 18 \%$ et $71 \pm 9 \%$ des protéines Nav1.5 et TfnR biotinylées au temps t_0 respectivement, sont toujours présentes. Après trente heures il ne reste que $18 \pm 8 \%$ des protéines Nav1.5 biotinylées et $29 \pm 8 \%$ des TfnRs marqués ($n=3$). Ces résultats nous ont permis de déterminer un temps de demi-vie de $20h50 \pm$ trois minutes ($n=7$) à la surface des cardiomyocytes (Figure 19B).

Les protéines Nav1.5 biotinilées à la membrane des cardiomyocytes, isolés de ratons nouveau-nés, ont une expression stable pendant quatre heures puis diminuent progressivement. Toutefois, le destin de ces protéines Nav1.5 biotinilées après leur marquage à la membrane reste à être déterminé. Soit ces protéines restent à la membrane jusqu'à leur endocytose et leur dégradation, soit elles sont endocytées dans des vésicules de stockage, soit elles sont recyclées plusieurs fois à la membrane plasmique avant d'être dégradées. Pour discerner entre ces deux hypothèses nous avons analysé l'endocytose du canal.

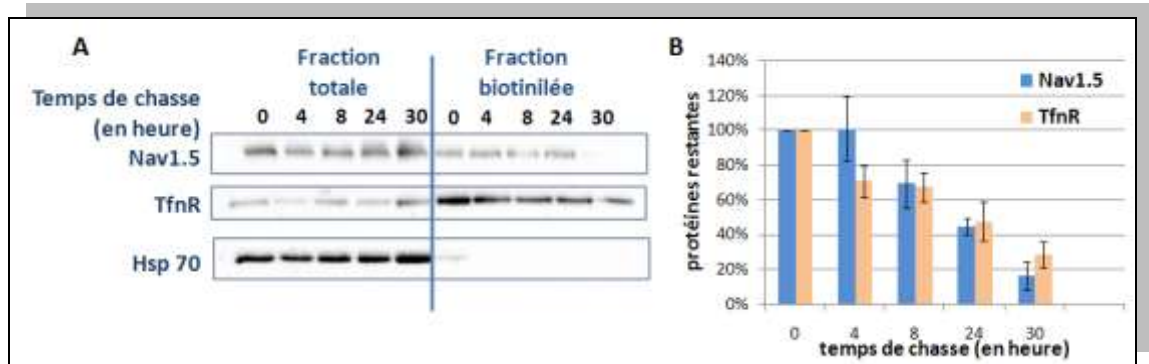


Figure 19: Etude de la stabilité de la fraction membranaire de Nav1.5

- A)** Les cardiomyocytes sont traités avec de la biotine imperméante pendant quinze minutes pour marquer les protéines membranaires. Les protéines biotinilées sont récupérées après zéro, quatre, huit, vingt-quatre et trente heures d'incubation dans un milieu de culture afin de déterminer le temps de vie des protéines membranaires. Pour s'assurer que la biotinylation ne touche que les protéines membranaires, la protéine cytoplasmique, Hsp70 est utilisée comme contrôle négatif et le récepteur à la transferrine, TfnR, comme contrôle positif. La fraction totale regroupe des protéines biotinilées et des protéines non biotinilées.
- B)** Les données sont exprimées en pourcentage de Nav1.5 ou TfnR mesuré au temps t en fonction de la quantité de Nav1.5 ou TfnR synthétisée en t_0 . Chaque point correspond à la valeur moyennée \pm sem d'au moins trois expériences distinctes.

1.6 La stabilité membranaire des canaux Nav1.5

Les résultats précédents montrent que 80 % de la fraction Nav1.5 présente à un instant t à la surface des cardiomyocytes disparaissent en trente heures. Il est vraisemblable que cette dégradation soit précédée d'une phase d'endocytose. En effet, les travaux de Rougier *et al* ont d'ores et déjà montré que l'ubiquitine ligase Nedd4-2 interagit avec le canal Nav1.5 et diminue l'expression membranaire du canal dans des systèmes de réexpression (Rougier *et al.* 2005). Par contre aucune étude n'a permis de quantifier directement l'endocytose du canal dans les cardiomyocytes.

Afin d'étudier l'endocytose de Nav1.5, les protéines membranaires sont dans un premier temps marquées à la biotine reliée par un pont disulfure à un groupement ester, ce groupement

ester réagit avec les amines primaires pour former une liaison covalente. Dans un deuxième temps, après avoir laissé aux cellules le temps d'endocyter une partie de leurs protéines de surface, il est possible de « dé-biotiniler » les protéines restées à la surface membranaire en utilisant un agent imperméant réducteur des ponts disulfures, tel que le Mesna. Dans ces conditions, les protéines endocytées restent biotinillées. Elles peuvent alors être purifiées et, dans cette fraction, les protéines d'intérêts quantifiées.

Les TfnRs ont été décrits pour être endocytés en dix minutes (Bleil et Bretscher 1982). Pour valider notre protocole, nous avons donc utilisé ce marqueur comme témoin positif dans nos expériences.

La Figure 20A illustre l'efficacité de la dé-biotinilation de Nav1.5 et du TfnR par le traitement au Mesna. Nous observons une absence totale de signal dans la fraction biotinillée des TfnRs, lorsque nous réduisons les ponts disulfures, immédiatement après le marquage (t_0). En revanche, lorsque les cellules sont incubées dix minutes à 37°C après le marquage, nous détectons un signal dans la fraction biotinillée des TfnRs qui correspond aux TfnRs endocytés. Par contre, la débiotinilation de Nav1.5 n'est pas aussi complète que celle du TfnR et la fraction endocytée en dix minutes n'apparaît pas très différente du bruit de fond. Malgré différentes mises au point nous n'avons pas réussi à éliminer cette contamination. Après avoir testé sans plus de succès des temps d'endocytose de quinze et trente minutes, nous avons augmenté les temps de chasse à deux, quatre, six, huit, douze voire même trente heures. La Figure 20B ne montre aucune variation du signal de Nav1.5 biotinilé dans ces conditions.

Notre travail a permis de mettre en place un protocole efficace pour étudier l'endocytose des protéines membranaires dans les cardiomyocytes en culture, isolés de cœurs de rats nouveau-nés. Cependant nous n'avons pas réussi après différentes mises au point à observer une endocytose du canal Nav1.5.

Ces observations suggèrent que les protéines Nav1.5 membranaires sont stables à la membrane et que lorsqu'elles sont endocytées elles sont rapidement dégradées.

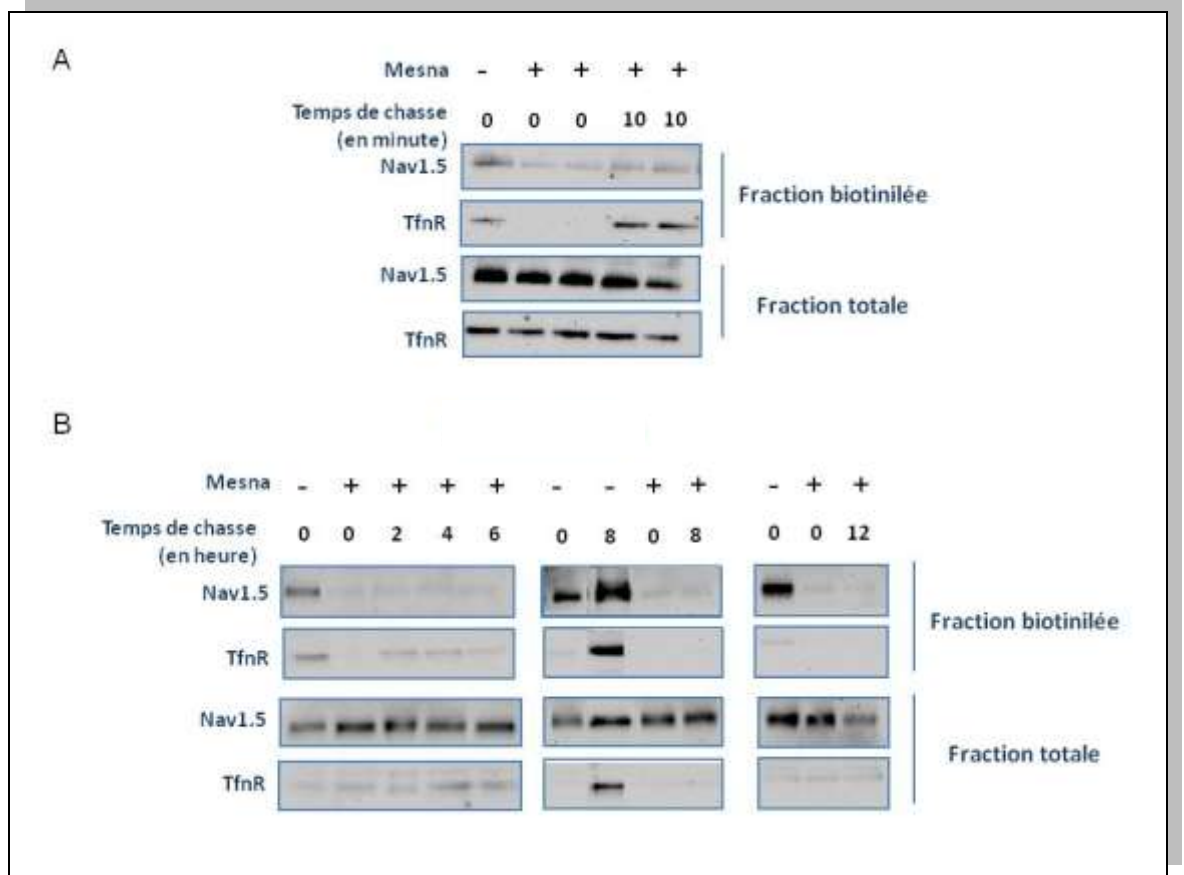


Figure 20: Le canal Nav1.5 est très stable à la membrane.

Les cardiomyocytes sont biotinilés pendant quinze minutes, puis ensuite les cellules sont incubées à 37°C dans leur milieu de culture pendant zéro et dix minutes (A) ou zéro, deux, quatre, six, huit, et douze heures (B). Les protéines membranaires biotinilées, puis endocytées au cours de l'incubation, sont récupérées grâce à des billes de streptavidine, après un traitement au mesna (3 fois vingt minutes, à 100 µM), pour cliver la biotine des protéines restées à la membrane. Ce clivage est total pour les TfnRs, mais il reste une contamination pour Nav1.5 (fraction biotinilée A et B au temps t₀). Le signal de biotinylation de Nav1.5 est constant quel que soit le temps de chasse de dix minutes à douze heures (A et B). En revanche le signal du TfnR est retrouvé à partir de dix minutes d'incubation à 37°C (A), puis ensuite ce signal est plus faible, le canal est recyclé en permanence, donc le TfnR perd son signal au cours des traitements au mesna.

La protéine Nav1.5 est en effet stabilisée à la membrane par son interaction avec de nombreuses protéines partenaires. Récemment un travail de Mohler *et al*, montrait que la liaison du canal Nav1.5 avec l'ankyrine G est essentielle pour stabiliser le canal à la membrane

des cardiomyocytes (Mohler *et al.* 2004). Pour l'heure, nous ne savons pas si l'ankyrine G participe à l'adressage du canal à la membrane ou si cette interaction se produit lorsque le canal est déjà ancré à la membrane plasmique. En parallèle, l'équipe de B. Dargent a montré que l'interaction de Nav1.2 avec l'ankyrine G est phosphorylation dépendante de la caséine kinase II (CKII) (Bréchet *et al.* 2008).

Afin de mieux comprendre l'interaction Nav1.5-ankyrine G, nous avons étudié l'influence de la CKII sur la liaison Nav1.5-ankyrine G.

1.7 L'interaction Ankyrine G –Nav1.5

L'ankyrine G est une protéine partenaire de Nav1.5 colocalisée avec les canaux aux disques intercalaires des cardiomyocytes. L'ankyrine G et Nav1.5 ont été co-immunoprécipitées (Mohler *et al.* 2004) et les domaines d'interaction entre ces deux partenaires ont été identifiés. La protéine Nav1.5 interagit avec le domaine MBD de l'Ankyrine G (Myosin-Binding-Domain) et l'ankyrine G avec la séquence **-VPIAVAESD-**, située dans la deuxième boucle intracellulaire, reliant les domaines DII-DIII (Lowe *et al.* 2008). La zone d'interaction de l'ankyrine avec Nav1.5 possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation pour la sérine-thréonine kinase, la caséine kinase II, CKII. La caséine kinase II est une kinase ubiquitaire constitutivement active. Une étude récente de B. Dargent et collaborateurs, montre que l'interaction du canal sodique neuronal Nav1.2 avec l'ankyrine G est dépendante d'une phosphorylation par la CKII et détermine la localisation du complexe dans le segment initial des axones des neurones. L'inhibition de la CKII conduit à une diminution des canaux sodiques et de l'ankyrine G dans les segments initiaux d'axone (Bréchet *et al.* 2008).

La zone d'interaction de Nav1.2 avec l'ankyrine G présente une grande homologie avec le domaine d'interaction de Nav1.5 et l'équipe de B. Dargent a commencé à analyser l'implication de la CKII dans l'interaction Nav1.5-ankyrine G. Dans le cadre d'une collaboration, cette équipe, a accepté de partager ses résultats d'expérience de Biacore avec nous. Leurs résultats montrent que l'affinité de la deuxième boucle intracellulaire de Nav1.5 pour le MBD de l'ankyrine G est augmentée d'un facteur 1000 en présence de la sous-unité catalytique de la CKII (Figure 21). La phosphorylation de la CKII augmente l'interaction du MBD de l'ankyrine avec la deuxième boucle intracellulaire de Nav1.5, *in vitro*. Nous nous sommes donc intéressés à l'interaction Nav1.5-ankyrine G, afin de savoir si cette interaction est aussi phosphorylation dépendante de la CKII dans les cardiomyocytes.

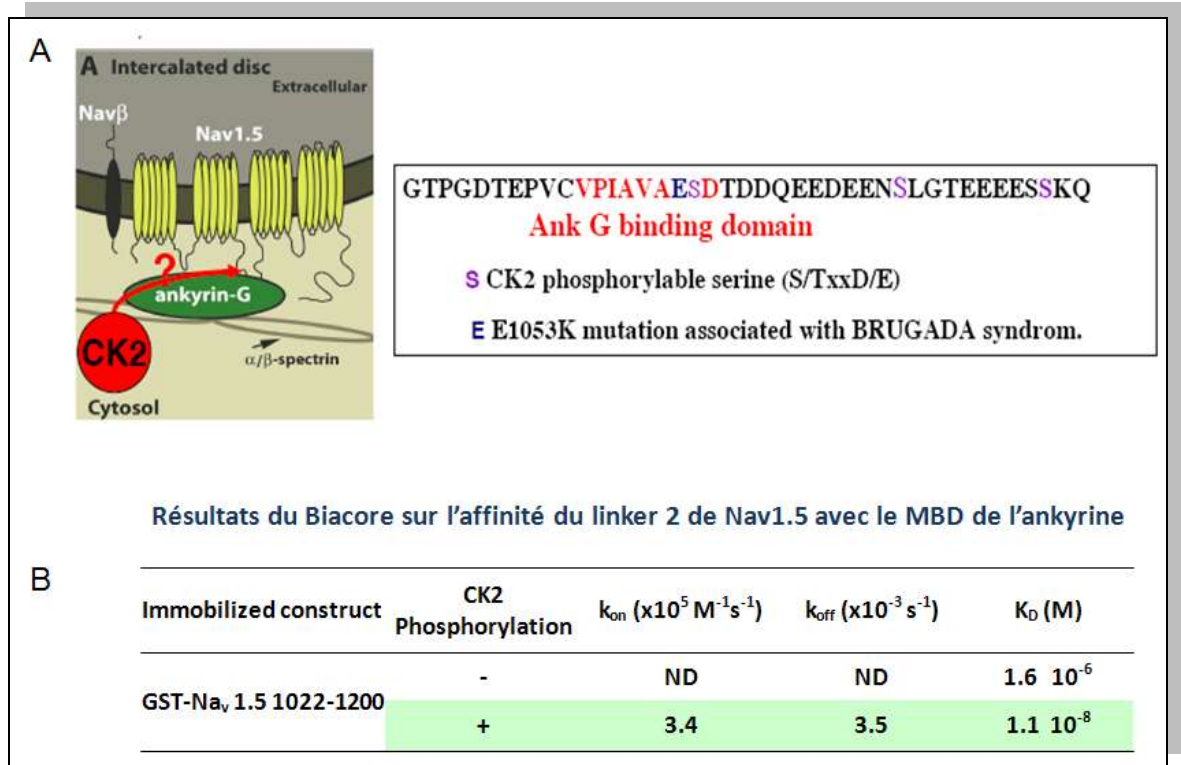


Figure 21 : L'interaction de Nav1.5 avec l'ankyrine G est-elle phosphorylation dépendante de la caséine kinase II ?

- A)** Schéma de l'interaction de l'ankyrine G avec Nav1.5 aux disques intercalaires et site d'interaction de Nav1.5 avec l'ankyrine G (Lowe *et al.* 2008).
- B)** Résultats du Biacore sur l'implication de la sous-unité catalytique active de la CKII sur l'interaction du MDB de l'ankyrine avec la boucle intracellulaire reliant les domaines DII et DIII de Nav1.5.

Pour l'heure, nos résultats n'ont pas montré que l'inhibition de la caséine kinase II modifie l'expression membranaire de Nav1.5 dans les cardiomyocytes en culture, isolés de cœurs de rats nouveau-nés.

Bien que l'interaction Nav1.5 ankyrine G ait déjà été démontrée par co-immunoprécipitation dans des cardiomyocytes de souris adultes (Mohler *et al.* 2004), nous n'avons jamais réussi à co-immunoprécipiter ces protéines dans des cardiomyocytes nouveau-nés en culture, que ce soit en présence ou en absence d'un inhibiteur perméant spécifique de la CKII, le DMAT (le 2-DiMethylAmino-4,5,6,7-Tetrabromo-1H-benzimidazole).

Comme l'illustre la Figure 22, l'ankyrine G est une protéine difficile à étudier. Cette protéine est fragile et se dégrade rapidement, ce qui expliquerait les faibles signaux obtenus par Western Blot à 190 kDa, poids moléculaire de l'isoforme cardiaque de l'ankyrine G (Cunha et Mohler 2006). Les signaux obtenus à 95, 90 et 72 kDa du western blot de la Figure 22, correspondent probablement à des produits de la dégradation de la protéine.

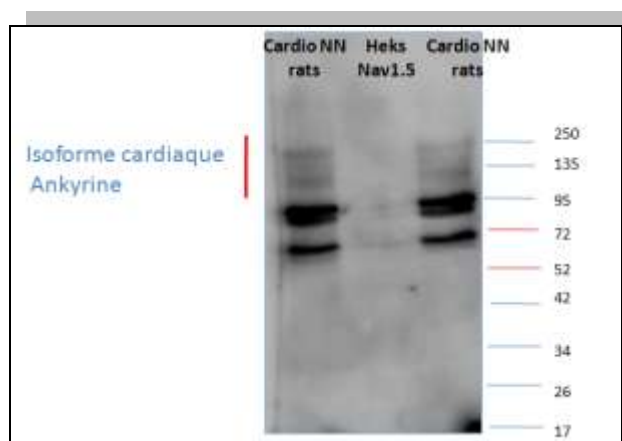


Figure 22 : L'expression de l'ankyrine G dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture.

Un signal léger au poids moléculaire attendu de l'ankyrine G (190-220 kDa), ainsi que d'autres signaux non spécifiques, sont perceptibles dans les dépôts de 50 μ g de protéines issues de cardiomyocytes isolés de cœurs de rats nouveau-nés (cardio NN rats). Aucun signal n'est détecté dans les dépôts des cellules HEK.

Nous avons alors adopté une nouvelle stratégie. L'ankyrine G est décrite pour stabiliser Nav1.5 à la membrane (Mohler *et al.* 2004). Si l'interaction Nav1.5 - ankyrine G est déstabilisée, l'expression membranaire de Nav1.5 devrait être diminuée. Pour vérifier cette hypothèse nous avons quantifié l'expression membranaire des canaux Nav1.5 en absence ou en présence de DMAT, par une approche biochimique d'une part et par une approche électrophysiologique d'autre part.

Ainsi, des cardiomyocytes isolés de cœurs de rats nouveau-nés, traités pendant trente heures avec 50 μ M de DMAT ou du DMSO sont biotinilés pendant une heure. Les protéines membranaires ont été précipitées avec des billes de streptavidine. Comme l'illustre la Figure 23, nous n'avons pas observé de modification de l'expression membranaire de Nav1.5 entre les cellules traitées au DMAT ou au DMSO. Nous avons aussi testé des temps de traitement au DMAT plus courts (une heure et six heures) ou plus longs à quarante-huit heures et des

concentrations plus faibles (10 μ M) pendant quatre heures, mais nous n'avons pas observé de modification de l'expression membranaire de Nav1.5.

En parallèle, des études de patch-clamp ont été réalisées sur des cardiomyocytes traités trente heures avec du DMAT ou du DMSO. Ni la cinétique des courants sodiques enregistrés ni la densité du courant n'est modifiée suite au traitement des cellules au DMAT.

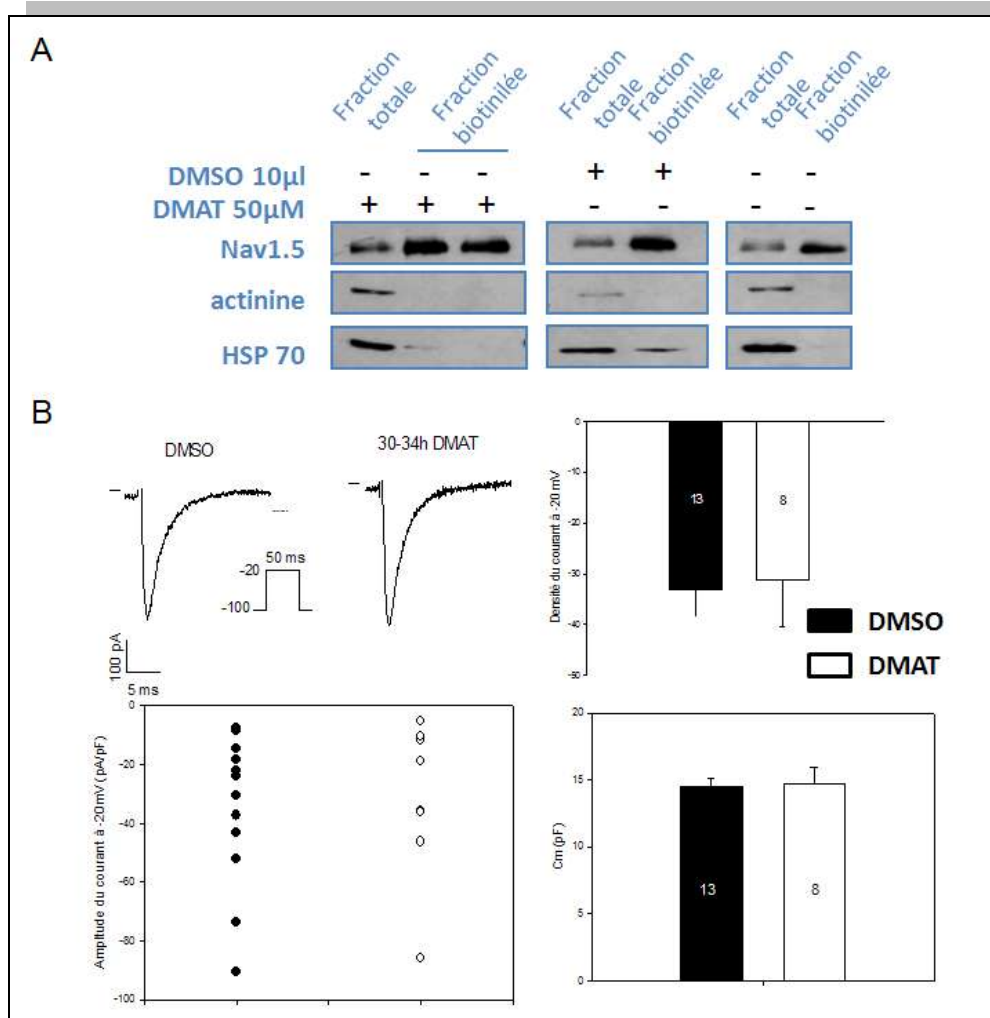


Figure 23: L'inhibition de la caséine kinase II ne modifie pas l'expression membranaire de Nav1.5.

- A)** Des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés, traités trente heures avec un inhibiteur de la caséine kinase II, 50 μ M de DMAT ou avec 10 μ l de DMSO, sont biotinilés pendant une heure. Les protéines biotinilées sont précipitées avec des billes de streptavidine. Les protéines, l'actinine et Hsp70 sont des protéines cytoplasmiques qui montrent bien que nous ne récupérons que des protéines membranaires dans les éluats de billes de streptavidine. Le signal de Nav1.5 biotinilé est le même entre les cellules traitées ou non avec le DMAT.
- B)** Le courant sodique a été enregistré à partir de cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés, traités trente heures avec un inhibiteur de la caséine kinase II, 50 μ M de DMAT ou avec 10 μ l de DMSO. Nous n'observons aucune modification des paramètres électrophysiologiques du courant sodique avec ou sans traitement au DMAT (résultats obtenus et mis en forme par Mr Yassine AMAROUCH).

2. Discussion

Nous avons pour objectif d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'expression et du trafic de Nav1.5 dans les cardiomyocytes de souris adultes afin :

- de déterminer le temps de biosynthèse du canal Nav1.5 ;
- de déterminer les mécanismes de la stabilisation de l'expression membranaire du canal à la surface des cardiomyocytes ;
- d'étudier l'interaction ankyrine G - Nav1.5.

2.1 La biosynthèse de Nav1.5

Nous avons estimé que le temps de demi-vie du canal Nav1.5 dans les cellules HEK est de 3h43.

A notre connaissance aucune étude de la biosynthèse de Nav1.5 n'avait été réalisée jusqu'à présent. Cependant, en 1986, l'équipe de Catterall avait estimé par technique de « pulse chase » radioactif le temps de demi-vie des canaux sodiques voltage-dépendants neuronaux à trente heures dans des cultures primaires de cellules neuronales (Schmidt et Catterall 1986). Dans ce travail, l'équipe de Catterall a analysé l'ensemble des isoformes des canaux sodiques exprimés dans des cellules neuronales et a suivi la dégradation des canaux sodiques néosynthétisés sur quatre jours (Schmidt et W A Catterall 1986). Pour notre part, nous avons estimé la demi-vie des canaux Nav1.5 exprimés dans un système de réexpression, les cellules HEK. Le temps que nous avons calculé ne considère que les quatre premières heures de dégradation. Or après quatre heures de dégradation, il reste encore 44 % de la protéine Nav1.5 et l'expression de Nav1.5 reste stable après six heures de dégradation. Nos résultats sont en accord avec ce qui a été établi pour d'autres canaux en système de réexpression. En effet, la demi-vie de Kv1.3 a été établie à quatre heures et celle de KCNQ1 à deux heures, dans des cellules HEK (Colley *et al.* 2007; Peroz *et al.* 2008), celle de Kv4.3 à neuf heures dans des cellules COS (Jiang *et al.* 2009), celle de KCNQ2 à deux heures dans des cellules CHO (Soldovieri *et al.* 2006) et celle de hERG à huit heures dans différents systèmes de ré-expression (Kagan *et al.* 2000).

Le modèle de ré-expression peut expliquer la différence observée entre nos résultats et ceux obtenus par l'équipe de Catterall (Schmidt et Catterall 1986). En effet, dans ce type de modèle, beaucoup de protéines non fonctionnelles sont produites, plus que dans des lignées primaires. Dans notre étude, le canal Nav1.5 est exprimé dans des cellules HEK qui expriment l'antigène T du virus SV40 participant ainsi à l'augmentation de la transcription des gènes sous le

contrôle du promoteur CMV. Pour le canal CFTR, il a été montré que seuls 25 % des canaux synthétisés donnent une protéine mature (Ward et Kopito 1994). Par ailleurs, une autre étude sur CFTR dans une lignée de cellules épithéliales, Calu-3, exprimant de manière endogène CFTR, montre des différences d'expression entre la protéine CFTR endogène et la protéine sur-exprimée. La maturation de la protéine endogène est mieux assurée que celle de la protéine sur-exprimée (Goldstein *et al.* 2007). Lorsque les cellules sont stressées, seule l'expression des ARNm codant les protéines endogènes est diminué, alors que celle des protéines sur-exprimées reste stable (Rab *et al.* 2007). Dans les lignées cellulaires, la biosynthèse et la maturation des protéines sur-exprimées ne sont pas assurées de la même façon que celles des protéines endogènes. Pour différentes raisons discutées plus loin les systèmes de ré-expression présentent donc des biais intrinsèques.

Il serait intéressant de pouvoir comparer le temps de demi-vie de Nav1.5 dans les cellules neuronales et celui dans les cardiomyocytes. Malheureusement nous n'avons pas réussi à déterminer ce temps de demi-vie dans ces cellules. Afin de déterminer précisément le temps de demi-vie de Nav1.5 dans le cœur, nous pourrions envisager de réaliser un « pulse chase » radioactif sur cœur entier, comme cela a été réalisé pour la connexine 43 (Beardslee *et al.* 1998). Cependant, il y a de grandes chances que nous soyons toujours confrontés à notre problème de contamination.

2.2 La stabilité du canal à la membrane

Toutefois, nous avons observé que les canaux Nav1.5 sont stables pendant quatre heures à la surface membranaire des cardiomyocytes et nous avons estimé que le temps de demi-vie des canaux Nav1.5 à la membrane des cardiomyocytes est de vingt-et-une heures. Ce temps est de l'ordre de grandeur de celui établi par l'équipe d'Abriel qui a déterminé en 2005, par patch clamp, un temps de demi-vie de treize heures dans des cellules HEK traitées à la bréfeldine A (un inhibiteur du transport vésiculaire post-Golgien) (Rougier *et al.* 2005). Ces résultats montrent une expression membranaire stable de Nav1.5. Nous avons aussi étudié l'endocytose de Nav1.5. Nous n'avons pas observé son endocytose ni sur des temps d'étude courts, de dix à trente minutes, ni sur des temps d'étude longs, de douze heures. Ces résultats suggèrent que le canal Nav1.5 est stable à la membrane des cardiomyocytes et est progressivement endocyté, puis directement dégradé après son endocytose. Un travail en cours dans le laboratoire a montré une interaction par double hybride de Nav1.5 avec la dynactine. La dynactine appartient au complexe dynéine-dynactine qui participe au transport rétrograde des

protéines. Récemment, ce complexe a été décrit pour participer à l'endocytose des canaux Kv1.5 (Choi *et al.* 2005). Nav1.5 est donc peut-être en partie internalisé par ce complexe et les autres canaux Nav1.5 sont pris en charge par le système ubiquitine-protéasome (Rougier *et al.* 2005).

La stabilité des canaux ioniques à la membrane plasmique est en partie assurée par leurs protéines partenaires. La dystrophine notamment, est décrite pour jouer un rôle fondamental dans l'expression membranaire de Nav1.5. Actuellement nous ne savons pas si elle participe au trafic de Nav1.5 à la membrane et / ou à sa stabilité membranaire, mais lorsqu'elle est absente, la quantité de protéines Nav1.5 membranaires est diminuée (Gavillet *et al.* 2006). Encore plus récemment, l' α -actinine 2 a également été décrite pour stabiliser l'expression membranaire de Nav1.5 (Ziane *et al.* 2010). L'ankyrine G est aussi décrite pour stabiliser l'expression membranaire de Nav1.2 et Nav1.6, ainsi que celle des canaux potassiques KCNQ2 et KCNQ3, dans les segments initiaux des axones (Pan *et al.* 2006; Zhou *et al.* 1998). Récemment, les interactions de l'ankyrine G avec ces canaux ioniques, localisés dans le segment initial des axones, ont été décrites pour être dépendantes d'une phosphorylation par la caséine kinase II (Bréchet *et al.* 2008). L'équipe de Mohler a montré que la mutation E1053K de Nav1.5, localisée dans le domaine d'interaction avec l'ankyrine G, induit une perte d'interaction des deux protéines, responsable d'une diminution du courant sodique (Mohler *et al.* 2004). De plus, l'absence d'ankyrine G déstabilise l'expression membranaire de Nav1.5 dans les cardiomyocytes (Lowe *et al.* 2008).

Nous avons tenté d'évaluer le rôle de la caséine kinase II sur la stabilisation membranaire de Nav1.5 par l'ankyrine G à la surface de cardiomyocytes de nouveau-nés. L'étude électrophysiologique ainsi que les études biochimiques de Nav1.5 ne montrent aucune modification de l'expression membranaire de Nav1.5 en absence ou en présence d'un inhibiteur de la caséine kinase II. Par ailleurs, nous n'avons pas réussi à retrouver l'interaction ankyrine G-Nav1.5 qui avait été décrite par Mohler à partir d'extraits totaux de cœurs (Mohler *et al.* 2004) bien que nous ayons essayé à partir de cellules en culture et à partir de lysats de cœurs adultes.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer nos difficultés à mettre en évidence l'interaction Ankyrine G - Nav1.5.

1) Il semblerait que l'isolement de l'ankyrine G soit délicat. Il s'agit d'une protéine de 190 kDa qui se cliverait rapidement quand elle n'est pas dans son environnement. L'équipe de Bouzidi évoquait également en 2002, les difficultés qu'ils avaient eues à co-immunoprécipiter Nav1.2 et l'ankyrine G (Bouzidi *et al.* 2002).

2) De plus, l'organisation des protéines du cytosquelette dans les cardiomyocytes néonataux en culture, qui n'est pas la même que dans les cardiomyocytes adultes, peut limiter l'interaction. La dystrophine, par exemple, a d'abord une localisation périnucléaire après deux jours de culture, et ne s'étend à toute la cellule qu'au bout du quatorzième jour de culture (Setoguchi *et al.* 1993). Pour remédier à ce problème, nous devrions essayer de faire ces expériences sur des cardiomyocytes adultes en culture.

Des études sur les canaux potassiques Kv4.2 et KCNQ1 suggèrent qu'ils s'associent précocement, dans le réticulum endoplasmique, avec leurs sous-unités régulatrices, KCHIP2 et KCNE1 respectivement. Ces sous-unités jouent également un rôle sur la stabilité de ces canaux à la membrane plasmique (Foeger *et al.* 2010; Kunjilwar *et al.* 2004; Peroz *et al.* 2009). L'équipe de Mohler a également mis en évidence une diminution de l'expression totale de Nav1.5 en absence de l'ankyrine G dans les cardiomyocytes suggérant une interaction précoce de Nav1.5 avec l'ankyrine-G, probablement dans le RE (Lowe *et al.* 2008). L'ankyrine G est donc suspectée d'intervenir dans le trafic de Nav1.5 à la membrane, ainsi que la sous-unité β_1 .

Les canaux Nav1.5 sont d'ailleurs décrits pour se lier à la sous-unité régulatrice β_1 dans le RE (Zimmer *et al.* 2002). D'autre part, dans des souris invalidées pour le gène codant pour β_1 , *Scn1b*, une augmentation de l'ARNm ainsi que de la protéine de Nav1.5 ont été observées (Lopez-Santiago *et al.* 2007). Dans un travail récent, Chioni *et al.*, ont également mis en évidence une répression de l'expression de Nav1.5 par β_1 dans une lignée de cellules cancéreuses du sein (Chioni *et al.* 2009). L'ensemble de ces travaux suggère que β_1 aurait non seulement un rôle de chaperonne mais aussi un rôle de facteur de transcription pour Nav1.5. Notre équipe a aussi récemment montré que la sous-unité régulatrice KCNE1 participe non seulement à la stabilité du canal KCNQ1 mais aussi à sa biosynthèse (Peroz *et al.* 2009). Toutefois nous n'avons pas observé d'influence de β_1 sur la biosynthèse de Nav1.5 dans les cellules HEK. La sous-unité β_1 pourrait réguler le trafic des canaux Nav1.5 après leur synthèse en masquant un site de rétention du RE puis participerait ensuite à sa stabilité membranaire, comme il a été décrit pour la libération de Nav1.8 du RE par la sous-unité β_3 (Zhang *et al.* 2008).

Le rôle de β_1 , vis-à-vis des canaux sodiques est très controversé en fonction du système d'étude (Ko *et al.* 2005). Ainsi, de façon surprenante, une étude sur la liaison de Nav1.1 avec β_1 ne montrait aucun effet chaperonne de la sous-unité β_1 vis-à-vis du canal Nav1.1 sauvage. Par contre une forme mutée de Nav1.1 était incapable de s'intégrer à la membrane plasmique en l'absence de β_1 (Rusconi *et al.* 2007). L'équipe de Zimmer en 2002, consciente des différences de résultats en fonction du système d'étude, a montré que les cellules HEK293 exprimant la sous-

unité β_1 , correspondent à un bon modèle pour étudier les mécanismes d'expression de Nav1.5 (Zimmer *et al.* 2002). Les différences de conditions expérimentales peuvent expliquer les variations observées entre les études.

Il paraît donc important de travailler dans un modèle cellulaire le plus « physiologique » possible qui exprime toutes les protéines partenaires des canaux ioniques.

Nous avons réalisé la majorité de nos études sur des cardiomyocytes issus de rats nouveau-nés. Ces cellules présentent l'avantage d'exprimer les protéines partenaires de Nav1.5 et représentent donc un modèle de choix pour l'étude de la biosynthèse et du trafic des canaux cardiaques à la membrane des cardiomyocytes. Toutefois la culture primaire de cardiomyocytes isolés de cœurs de rats ou de souris présente des inconvénients. Ces cultures sont en effet souvent contaminées par des fibroblastes : pour notre part, nous avons en général 30 % de contamination dans nos cultures de cardiomyocytes nouveau-nés. Récemment, il a été montré que les fibroblastes expriment différents canaux ioniques, dont Nav1.5 (Li *et al.* 2009). Cette expression de Nav1.5 dans les fibroblastes pourrait biaiser nos résultats. Toutefois, l'expression de Nav1.5 dans les cardiomyocytes est très importante et les cardiomyocytes sont majoritaires dans nos cultures. De plus, d'après l'étude menée sur les fibroblastes, il semblerait que ce soit l'isoforme néonatal de Nav1.5 qui soit présent dans ces cellules. Les caractéristiques du courant sodique sont donc différentes entre les fibroblastes et les cardiomyocytes (Li *et al.* 2009; Wu *et al.* 2006). Pour l'étude de Nav1.5, cette contamination des cultures de cardiomyocytes par les fibroblastes n'est donc pas forcément un gros inconvénient, à condition de ne pas garder trop longtemps les cellules en culture, car les fibroblastes cardiaques se multiplient plus rapidement que les cardiomyocytes.

2.3 Le modèle cellulaire

Les cardiomyocytes des souris et des rats nouveau-nés proviennent d'organismes en développement, dans lesquels l'expression des protéines est en cours d'évolution. Ainsi en fonction de l'âge des animaux au moment de l'isolement, les protéines exprimées ne sont pas les mêmes et ne sont pas présentes dans les mêmes proportions. Le canal Nav1.5 et sa sous-unité régulatrice β_1 ont une expression qui augmente graduellement entre l'état fœtal, néonatal et adulte (Domínguez *et al.* 2005; Harrell *et al.* 2007). De plus, au stade néonatal, l'isoforme néonatal de Nav1.5 est encore présent (Chioni *et al.* 2005). Il est donc important de toujours réaliser les isollements sur des animaux ayant le même âge pour éviter une variabilité trop importante entre les isollements.

D'autre part, les cardiomyocytes néonataux ne sont pas organisés morphologiquement. Les protéines du cytosquelette sont en train de se développer et de s'organiser, ce qui explique l'absence de tubules-T à ce stade (les T-tubules apparaissent au bout du sixième ou neuvième jour après la naissance) (Seki *et al.* 2003). Les cellules mises en culture sont isolées les unes des autres, les jonctions cellulaires et donc les complexes qui les composent sont dissociés.

Or l'association précoce des canaux avec leurs sous-unités régulatrices, permet la constitution de complexes protéiques qui vont s'insérer à des lieux stratégiques sur les cellules. Ainsi les canaux Nav1.5 associés à l'ankyrine G sont principalement localisés aux disques intercalaires avec la sous-unité β_1 phosphorylée et les canaux Kv4.2 (Deschênes *et al.* 2008; Lowe *et al.* 2008; Meadows et Isom 2005). Les canaux sodiques associés avec la syntrophine sont exprimés sur les membranes latérales des cardiomyocytes (Gavillet *et al.* 2006).

Certes, les cardiomyocytes adultes en culture restent le matériel le plus approprié pour étudier Nav1.5 et son incidence dans des pathologies évolutives chez l'adulte. Les cardiomyocytes adultes sont morphologiquement organisés et ont une expression de protéines qui s'est stabilisée avec l'âge. Nous avons essayé d'isoler et de mettre en culture des cardiomyocytes adultes de souris. Notre objectif était initialement de travailler uniquement sur ces cellules pour pouvoir étudier le trafic de Nav1.5 et ensuite transposer notre travail dans les cardiomyocytes isolés de cœurs de souris *Scn5a*^{+/-}. Nous nous sommes inspirés du travail de l'équipe de O'Connell qui a mis en place un protocole permettant d'obtenir un million de cardiomyocytes à partir d'un cœur de souris et a optimisé la culture de ces cellules sur soixante-douze heures (O'Connell *et al.* 2007). Nous avons réussi à isoler un nombre important de cardiomyocytes, en moyenne 800 000 par cœur de souris et à les maintenir en vie vingt-quatre heures. Les cardiomyocytes isolés de souris adultes en culture sont moins stables que ceux de lapins ou de rats. Les cardiomyocytes obtenus à partir de ces animaux peuvent être maintenus en culture sur plusieurs semaines, alors que les cultures de cardiomyocytes de souris adultes sont stables uniquement soixante-douze heures (Banyasz *et al.* 2008; Mitcheson *et al.* 1998). Toutefois plusieurs études ont montré sur ces cardiomyocytes adultes maintenus plusieurs jours en culture, une rapide décroissance du nombre de T-tubules en soixante-douze heures, un raccourcissement des cardiomyocytes et surtout une modification des propriétés électrophysiologiques de ces cellules (Banyasz *et al.* 2008; Mitcheson *et al.* 1998; Zhou *et al.* 2000). Suite au changement d'environnement, l'expression des canaux ioniques en culture est modifiée, notamment ceux localisés avec les protéines d'ancrage. Le renouvellement des

protéines n'est pas forcément assuré, les cellules retirées de leur milieu ne se développent plus de la même façon. Les voies de stress sont principalement activées, les phosphorylations sont donc modifiées (Mitcheson *et al.* 1998).

En conclusion, pour étudier les canaux ioniques, il est plus facile de travailler dans un premier temps avec un système de réexpression, tout en restant vigilant sur les interprétations, ou sur les cardiomyocytes isolés de cœurs de souris ou de rats nouveau-nés, puis de vérifier ces résultats sur des cardiomyocytes isolés d'animaux adultes, dans l'idéal fraîchement isolés, notamment pour les techniques de patch-clamp, ou cultivés pendant moins de soixante-douze heures.

ETUDE DES MIRNAS DANS LES CŒURS DE SOURIS *Scn5a*^{+/-}

1. Résultats

Les souris, invalidées de façon hétérozygote pour le gène *Scn5a*, développent pour la moitié d'entre elles des troubles sévères de la conduction associés avec l'apparition d'une fibrose ventriculaire au cours du vieillissement. Nous avons récemment montré que le développement de ces troubles de la conduction est lié à une différence d'expression de Nav1.5, au niveau protéique, entre les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère » et celles avec un phénotype « mineur ». En effet, bien que dans les deux types de souris *Scn5a*^{+/-}, l'expression de l'ARNm soit diminuée de près de 50 %, les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère » ont une diminution de l'expression de la protéine de Nav1.5 de 50 ± 4 % alors que les souris à phénotype « mineur » n'ont qu'une diminution de 21 ± 7 % de Nav1.5 (Leoni *et al.* 2010).

L'une de nos hypothèses pour expliquer cette différence de phénotype est l'implication de miRNAs exprimés différemment selon le phénotype.

1.1 Etude des miRNAs dans des jeunes souris

Notre premier objectif a été de déterminer si un miRNA est impliqué dans le développement des troubles de la conduction dans les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère ». Nous avons étudié l'expression des miRNAs chez des souris jeunes de sept semaines, période où la différence phénotypique apparaît, afin de nous affranchir des variations d'expression de miRNAs secondaires aux troubles de la conduction. Les animaux de sept semaines sont encore jeunes, les phénotypes se développent. Ainsi pour nous assurer des phénotypes des animaux, nous avons réalisé deux ECGs à une semaine d'intervalle. Les animaux ont été sacrifiés au plus tard une semaine après le dernier ECG. Ensuite l'ARN total de ventricules gauches, avec leur septum, de vingt-quatre souris (six souris sauvages, neuf souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « mineur » et neuf souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère ») a été purifié (Tableau 3). A partir de ces isollements d'ARNs, nous avons analysé l'expression de 567 miRNAs de souris et dix miRNAs du virus de l'*Herpes* de la souris à l'aide de puces de détection de miRNAs (Agilent).

Tableau 3: Caractéristiques des animaux de sept semaines étudiés par puce Agilent

Animaux	Génotype	Intervalle QRS (en ms)		Phénotype
		semaine 5	semaine 6	
B886	sauvage	11	12	sauvage
B930	sauvage	10	16	sauvage
B938	sauvage	10	10	sauvage
B942	sauvage	11	10	sauvage
B948	sauvage	10	11	sauvage
B949	sauvage	9	11	sauvage
B878	$Scn5a^{+/-}$	16	15	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B918	$Scn5a^{+/-}$	12	14	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B929	$Scn5a^{+/-}$	13	9	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B932	$Scn5a^{+/-}$	16	14	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B939	$Scn5a^{+/-}$	12	12	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B941	$Scn5a^{+/-}$	11	13	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B947	$Scn5a^{+/-}$	11	11	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B952	$Scn5a^{+/-}$	12	13	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B954	$Scn5a^{+/-}$	12	13	$Scn5a^{+/-}$ « mineur »
B892	$Scn5a^{+/-}$	15	17	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B922	$Scn5a^{+/-}$	11	18	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B924	$Scn5a^{+/-}$	14	22	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B927	$Scn5a^{+/-}$	13	18	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B931	$Scn5a^{+/-}$	13	20	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B937	$Scn5a^{+/-}$	12	21	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B940	$Scn5a^{+/-}$	11	17	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B946	$Scn5a^{+/-}$	12	22	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »
B950	$Scn5a^{+/-}$	14	20	$Scn5a^{+/-}$ « sévère »

L'expression des miRNAs est étudiée grâce à des sondes qui émettent une fluorescence proportionnelle à la proportion de miRNAs exprimés dans un échantillon. Les intensités de fluorescence étaient comprises entre 67 et 74 000. Nous avons étudié uniquement les sondes émettant une intensité de fluorescence supérieure à 100 après normalisation (100 étant l'intensité de fluorescence correspondant au bruit de fond). Pour un même miRNA, dix ou vingt sondes identiques sont présentes sur les puces. Il est fréquent que le signal d'une sonde pour un échantillon varie en fonction de sa localisation. Nous avons donc étudié l'expression des miRNAs pour lesquels cinq sondes minimum avaient une intensité de fluorescence supérieure à 100.

Cette sélection, nous a permis d'étudier l'expression de 130 miRNAs différents dans le cœur des souris.

Pour chaque miRNA, nous avons calculé la valeur moyenne d'intensité de fluorescence des sondes permettant son étude. Etant donné que le signal des sondes est directement proportionnel à la quantité de miRNAs exprimés, nous avons classé l'expression des 130 miRNAs en ordre décroissant. Ce classement a mis en évidence que la majorité des miRNAs ont une expression faible. En effet, seules les sondes de 68 miRNAs, sur les 130 étudiés, avaient une intensité de fluorescence comprise entre 100 et 200. Uniquement trente-deux miRNAs avaient des sondes dont le signal de fluorescence était supérieur à 500 (Tableau 4). Parmi ces trente-deux miRNAs, seules les sondes correspondant à miR-1 et miR-133b avaient une intensité de fluorescence supérieure à 10000. Les sondes de miR-1 avaient une intensité plus de deux fois supérieure à celles de miR-133b. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en 2002 par l'équipe de Lagos-Quintana, qui montrait que miR-1 représente 45 % des miRNAs exprimés dans le cœur (Lagos-Quintana *et al.* 2002). De façon intéressante, nous avons aussi observé une forte expression d'un miRNA encore inconnu, miR-720, dont le signal de fluorescence des sondes correspondantes est de 7240 ± 461 . Aucune fonction n'est encore attribuée à miR-720 dans la littérature (Tableau 4).

Dans l'objectif d'identifier les miRNAs exprimés différemment entre les souris sauvages et les souris *Scn5a*^{+/-}, un classement des échantillons a été effectué en fonction de la valeur de fluorescence médiane de chaque sonde dans les différents échantillons (logiciel *Cluster*). Ce logiciel permet aussi de regrouper les sondes et les échantillons ayant le même profil. De ce traitement informatique, une représentation graphique appelée carte thermique, a été établie par le programme *Treeview* (Figure 24). Les sondes ayant une intensité de fluorescence inférieure à la valeur médiane sont représentées en vert et celles qui ont une valeur supérieure sont représentées en rouge. Cette représentation graphique de comparaison de l'intensité de fluorescence des sondes pour chaque échantillon permet de repérer rapidement les miRNAs exprimés différemment entre les différentes conditions. La Figure 24 ne montre pas de regroupement des échantillons en fonction des phénotypes des souris quand l'analyse a été effectuée à partir des données brutes normalisées.

Cette première analyse ne permettait pas de distinguer des miRNAs exprimés différemment de manière significative.

Tableau 4: MiRNAs les plus exprimés dans le cœur de souris détectés par les puces Agilent.

miRNAs	sauvage	SEM	<i>Scn5a</i> ^{+/-} «mineur»	SEM	<i>Scn5a</i> ^{+/-} «sévère»	SEM
mmu-miR-1	22962	2639	27975	3078	29239	2997
mmu-miR-133b	11072	1366	11282	1403	10640	1296
mmu-miR-720	7894	1129	6115	881	7709	1080
mmu-miR-133a	6460	1068	6563	1086	6232	1011
mmu-miR-22	5574	316	5231	307	5453	329
mmu-miR-126-3p	4116	200	4119	200	3997	202
mmu-miR-451	3029	108	2806	90	2699	67
mmu-miR-24	2874	113	2842	106	2937	99
mmu-miR-23a	2119	199	2219	196	2231	194
mmu-miR-27a	1695	106	1840	121	1780	113
mmu-miR-26a	1559	77	1458	82	1461	88
mmu-miR-29a	1553	138	1601	133	1476	125
mmu-miR-30a	1448	134	1321	126	1155	113
mmu-miR-29b	1378	205	1450	194	1138	151
mmu-miR-29c	1366	22	1398	21	1213	21
mmu-miR-30e	1242	118	1126	111	961	95
mmu-miR-125b-5p	1114	164	1198	175	1205	178
mmu-miR-23b	1114	104	1174	110	1207	116
mmu-miR-378	1112	66	1012	60	1033	62
mmu-miR-499	1079	16	1043	16	1009	17
mmu-miR-133a*	1039	83	1055	82	1037	78
mmu-miR-30c	945	99	924	97	867	91
mmu-miR-21	924	67	1025	70	911	64
mmu-miR-15a	860	11	872	9	865	10
mmu-miR-130a	857	18	885	17	808	16
mmu-miR-27b	810	91	803	94	811	94
mmu-miR-16	746	62	717	58	731	60
mmu-miR-30b	729	100	702	94	657	88
mmu-miR-26b	722	30	795	33	794	34
mmu-miR-99a	693	82	723	88	704	85
mmu-miR-143	642	26	660	26	678	27
mmu-miR-30d	569	11	523	11	515	10

Ce tableau regroupe les trente-deux miRNAs dont les sondes avaient une intensité moyenne relative de fluorescence supérieure à 500. Les valeurs représentées ici correspondent aux valeurs moyennes des vingt sondes de détection des miRNAs, moyennées pour chaque échantillon. Ces moyennes ont ensuite été moyennées entre elles afin d'obtenir une valeur moyenne d'intensité relative pour chaque miRNA et pour chaque catégorie d'animaux. Chaque groupe est composé de six animaux au minimum.

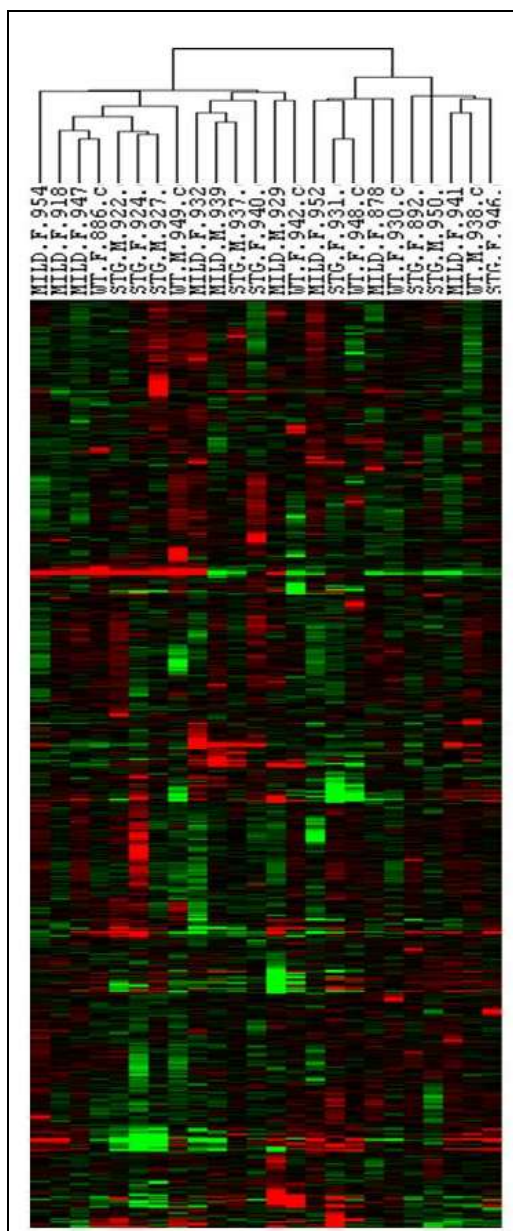


Figure 24: Classification hiérarchique des miRNAs en fonction des 24 échantillons de ventricules gauches de souris sauvages ou *Scn5a*^{+/-}.

Chaque ligne représente une sonde d'un miRNA et chaque colonne un échantillon. Chaque case colorée correspond à la valeur d'intensité de fluorescence d'une sonde de détection d'un miRNA par rapport à la valeur médiane du signal de fluorescence de la sonde, pour chaque échantillon. La gamme s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé).

Après différentes tentatives d'analyses, les échantillons ont été classés en fonction de la durée de l'intervalle QRS des souris correspondantes. Quarante sondes (soit 0,2 % des sondes présentes sur la lame) ont été détectées différentes entre les souris avec des valeurs d'intervalle QRS inférieures à 17 ms et les souris avec des valeurs d'intervalle QRS supérieures à 17 ms (Figure 25). Six sondes correspondant à miR-1 présentaient un fort signal dans les ventricules gauches des cœurs de souris avec une valeur de QRS supérieure à 17 ms et trois sondes de miR-30a avaient un faible signal dans ces mêmes échantillons. Toutefois, la Figure 25B montre que la corrélation entre l'intensité de fluorescence des sondes en fonction de la valeur de l'intervalle QRS des souris étudiées est peu marquée.

Pour analyser plus finement nos résultats, les signaux de fluorescence des sondes présentes sur la carte thermique ont été moyennés et représentés en histogramme. Comme l'illustre la Figure 25C, les différences d'expression de miR-1 et miR-30a entre les cœurs de souris avec un intervalle QRS supérieur à 17 ms et ceux issus de souris avec un intervalle QRS inférieur à 17 ms sont faibles. En effet, miR-1 n'était sur-exprimé que de 18 ± 4 % et miR-30a n'était sous-exprimé que de 24 ± 5 % dans les ventricules gauches des souris ayant des valeurs d'intervalle QRS supérieures à 17 ms. Cependant, dans la littérature, il n'est pas rare d'observer de faibles différences d'expression de miRNAs. Dans son travail sur l'expression de miR-21 dans l'infarctus du myocarde, l'équipe de Thum ne détectait aucune variation d'expression de miRNAs aux stades précoces de la maladie (Thum *et al.* 2008). De plus, pour déterminer le phénotype de ces jeunes souris, nous avons réalisé deux ECGs à une semaine d'intervalle et observé des différences d'une semaine à l'autre. Les souris étudiées dans cette première étude étaient donc jeunes avec des phénotypes en cours d'évolution.

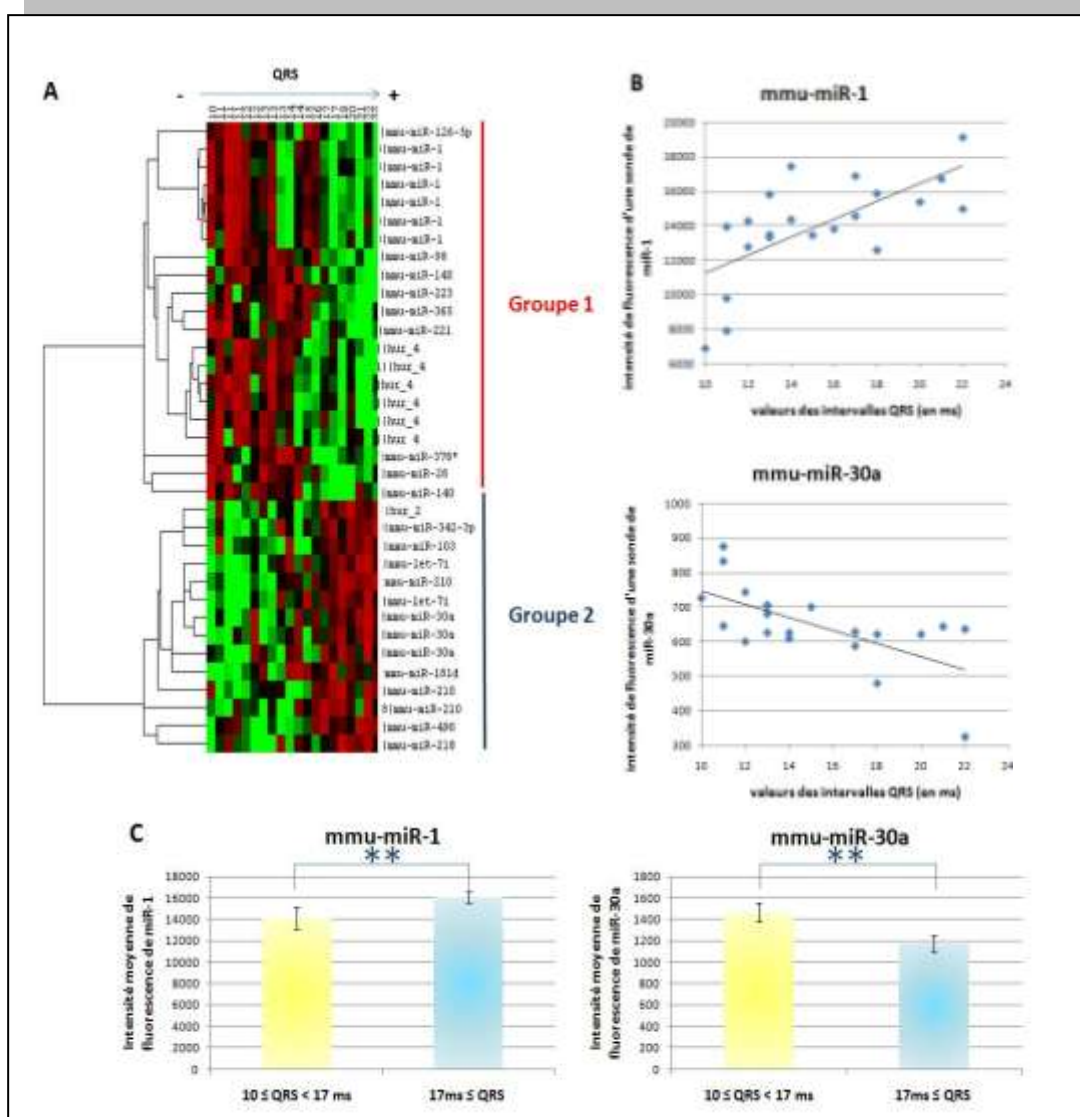


Figure 25: miR-1 et miR-30a sont exprimés différemment dans les ventricules gauches des souris avec des intervalles QRS supérieurs à 17 ms.

- A) Classification des miRNAs en fonction des intervalles QRS des souris. Deux groupes se différencient, le groupe un où les miRNAs sont sur-exprimés dans les échantillons avec des valeurs d'intervalles supérieures à 17 ms. Le groupe deux regroupe les miRNAs sous-exprimés dans ces échantillons (ATTENTION ICI LES COULEURS SONT INVERSEES, ROUGE POUR LES VALEURS LES PLUS FAIBLES ET VERT POUR LES VALEURS LES PLUS HAUTES). Après classification des valeurs, nous avons gardé dix-neuf échantillons.
- B) Graphes de corrélation de l'intensité de fluorescence d'une sonde de miR-1 et de miR-30a en fonction de la valeur de l'intervalle QRS des souris (le coefficient de corrélation de l'intensité de fluorescence de la sonde miR-1 avec les valeurs des intervalles QRS, $R^2 = 0,44$ et la droite a une pente de 514 et pour miR-30a, $R^2 = 0,42$ et la droite a une pente de -19).
- C) Représentation en histogrammes des intensités de fluorescence moyennées pour les six sondes de miR-1 regroupées dans la figure A et les trois sondes de miR-30a. La différence d'expression entre les animaux ayant un intervalle QRS supérieur à 17 ms et ceux ayant un intervalle QRS compris entre 13 et 17 ms est faible (Les valeurs sont moyennées \pm sem d'au moins sept animaux). Les résultats sont soumis à un test de Mann et Whitney (** $p < 0,01$).

Nous étions étonnés de ne pas avoir plus de miRNAs différentiels entre les différentes souris étudiées, plus particulièrement entre les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « mineur » et les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère ». Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus et refaire un criblage de l'expression des miRNAs dans les cœurs de jeunes souris, en nous orientant vers la technique d'amplification de l'ADNc en temps réel, en carte microfluidique. La RT-PCR quantitative (amplification de l'ADNc précédée d'une transcription inverse) par la technique *TaqMan*, est une technique fiable pour quantifier les niveaux d'expression des ARNs. La technique a été adaptée pour étudier l'expression des miRNAs.

Une carte microfluidique permet d'étudier l'expression de 335 miRNAs simultanément avec cinq contrôles différents pour un animal. Les cartes ne contiennent qu'une sonde *TaqMan* et deux amorces spécifiques pour un miRNA. Les TLDA et les puces Agilent ont 331 miRNAs en commun.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des TLDA sur les échantillons des ventricules gauches isolés des cœurs de souris de sept semaines, utilisés pour les puces Agilent. Tous les ADNc des miRNAs, ayant une amplification tardive, c'est-à-dire supérieure à 32 Ct, ont été exclus de l'étude. Ainsi les TLDA ont permis la détection de l'expression de 117 miRNAs dans le ventricule gauche des cœurs de souris. Les puces Agilent permettaient de détecter 130 miRNAs.

L'étude des ventricules gauches des cœurs de souris âgées de sept semaines a permis de mettre en évidence l'expression de 83 miRNAs par ces deux techniques. Après analyse des TLDA, nous avons l'expression relative (en $2^{-\Delta Ct}$) de chaque miRNA pour chaque échantillon. Le classement des miRNAs en fonction de leur expression relative montre que les miRNAs détectés par les TLDA avaient une expression comprise entre 0,02 et 657. Seuls dix-sept miRNAs avaient une expression relative supérieure à dix, et seuls miR-133a et miR-126-3p avaient une expression relative supérieure à cent. MiR-133a avait une expression majoritaire de $(2^{-\Delta Ct})_{\text{miR-133a}} = 545 \pm 14,5$ (n=17) dans les cœurs de souris et de façon inattendue, miR-1 était neuf fois moins exprimé ($(2^{-\Delta Ct})_{\text{miR-1}} = 58 \pm 2,6$ (n=20)) dans nos échantillons que miR-133a. Par ailleurs, les cartes microfluidiques utilisées dans notre étude ne permettaient pas l'analyse de miR-720.

Les puces Agilent et les TLDA s'accordent sur le faible taux d'expression des miRNAs dans les ventricules gauches des cœurs de souris. Par contre, elles ne présentent pas le même ordre d'expression des miRNAs. Les TLDA montrent une forte expression de miR-133a dans les cœurs de souris.

Les deux techniques ne donnent pas les mêmes résultats, cependant elles s'accordent sur le faible taux d'expression des miRNAs. Les différences de résultats entre les deux techniques s'expliquent probablement par cette faible expression.

Tableau 3 : Les miRNAs les plus exprimés dans les cœurs de souris de sept semaines mis en évidence par TLDA.

miRNAs	sauvages		<i>Scn5a</i> ^{+/-} « mineur »		<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	
	expression moyenne des miRNAs	SEM	expression moyenne des miRNAs	SEM	expression moyenne des miRNAs	SEM
mmu-miR-133a	563	20	537	8	568	40
mmu-miR-126-3p	176	20	167	13	161	12
mmu-miR-133b	96	6	112	6	98	6
mmu-miR-145	65	4	66	3	63	2
mmu-miR-24	77	12	72	7	71	7
mmu-miR-1	60	5	61	5	54	2
mmu-miR-30c	59	9	64	9	57	7
mmu-miR-30b	37	3	34	2	33	2
mmu-miR-19b	25	2	25	2	22	1
mmu-miR-29a	21	1	21	1	19	1
mmu-miR-191	24	3	23	2	24	2
mmu-miR-16	21	2	20	1	20	2
mmu-miR-26a	11	0	11	1	11	0
mmu-miR-125b-5p	12	0	13	1	12	1
mmu-miR-100	10	1	10	1	10	0
mmu-miR-100	12	1	11	1	11	0

Nous observons la même répartition des miRNAs entre les souris sauvages, les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère ». Aucun de ces miRNAs n'est exprimé différemment entre les trois groupes de souris (test de Kruskal-Wallis).

Pour comparer les différences d'expression de l'ensemble des miRNAs nous avons calculé les $\Delta\Delta Ct$. Le $\Delta\Delta Ct$ correspond à la différence des valeurs relatives (ΔCt) de l'expression d'un miRNA dans une condition par rapport à une autre. Ces valeurs logarithmiques sont ensuite transformées en valeur linéaire, en calculant les $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspond donc au ratio d'expression d'un miRNA dans un type de souris par rapport à son expression dans un autre type de souris. Une valeur de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proche de un signifie que l'expression du miRNA n'est pas différente entre les deux conditions comparées, les valeurs de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ différents de un permettent de repérer rapidement les miRNAs différentiels entre les deux conditions étudiées.

Dans l'objectif de repérer rapidement les miRNAs différemment exprimés entre les conditions, nous avons regroupé tous les $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculés à partir des souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « mineur » versus les souris sauvages sur un graphe. Nous avons fait de même pour les $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculés à partir des souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère » versus les souris sauvages et ceux calculés à partir des souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère » versus celles à phénotype « mineur ». Seule l'expression de 92 miRNAs a été étudiée, car nous n'avons analysé que les miRNAs ne variant que de $\pm 0,5$ Ct entre les échantillons d'un même phénotype.

Les trois graphes (Figure 26a), montrent que la majorité des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculés pour les trois rapports, ont une valeur proche de un, notamment les $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculés pour miR-1 et miR-30a représentés en jaune sur les graphes. Ces marques jaunes sont noyées dans les autres valeurs de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (en bleu).

Sur les deux premiers graphes, la valeur du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculée pour miR-23a (représentées en rouge) est inférieure à un, $(2^{-\Delta\Delta Ct})_{miR-23a} = 0,67$, quand on compare les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « mineur » versus les souris sauvages ; $(2^{-\Delta\Delta Ct})_{miR-23a} = 0,72$ quand on compare les souris *Scn5a*^{+/-} à phénotype « sévère » versus les souris sauvages. Ce résultat suggère que l'expression de miR-23a est moins importante dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » (graphe1) et dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » (graphe 2) par rapport aux cœurs de souris sauvages. En revanche, la valeur de ce $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculé pour miR-23a, entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et celles avec un phénotype « sévère », est proche de un (graphe 3).

Pour étudier plus finement cette variation, nous avons tracé l'histogramme moyennant l'expression relative de miR-23a, $(2^{-\Delta Ct})_{\text{miR-23a}}$, pour chaque phénotype. Cet histogramme montre une sous-expression de miR-23a de $28 \pm 8 \%$ dans les ventricules gauches des cœurs des souris *Scn5a*^{+/-}, issus des souris avec un phénotype « mineur » et de $27 \pm 8\%$ dans ceux issus des souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère », par rapport à l'expression de ce miRNA dans les cœurs de souris sauvages (histogramme de la Figure 26b). En revanche l'expression de miR-23a est invariante dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} quel que soit leur phénotype.

MiR-23a est un miRNA dont le gène est localisé sur le chromosome 8. Ce miRNA a été décrit pour être un marqueur précoce de l'hypertrophie. Il cible une protéine anti-hypertrophie (Muscle specific Ring Finger protein 1, MuRF1). L'expression de ce miRNA est sous le contrôle direct du facteur de transcription NFATc3 (Lin *et al.* 2009).

Pour vérifier les résultats de la puce Agilent, les histogrammes moyennant les expressions relatives de miR-1, $(2^{-\Delta Ct})_{\text{miR-1}}$, et de miR-30a, $(2^{-\Delta Ct})_{\text{miR-30a}}$, ont été tracés, mais ils ne montrent aucune différence significative de l'expression de ces miRNAs entre les trois phénotypes (histogramme de la Figure 26C).

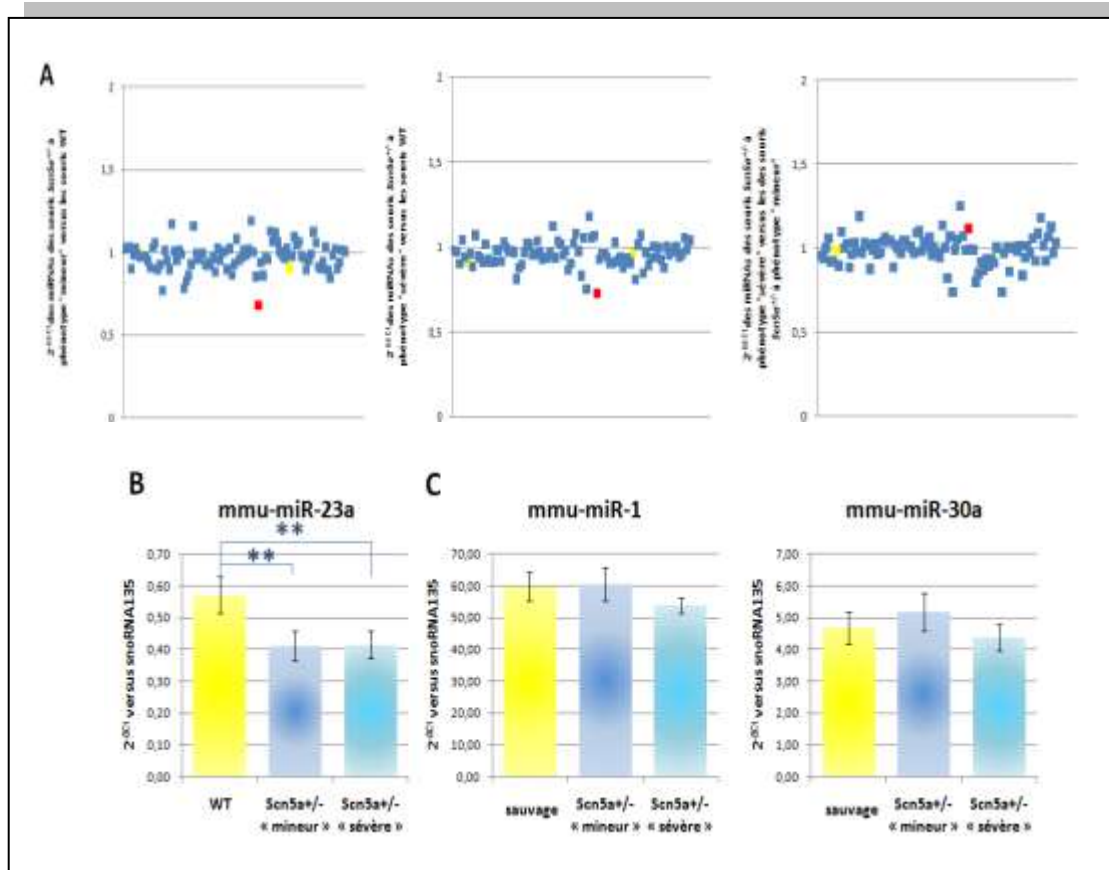


Figure 26: Expression des miRNAs cardiaques des souris âgées de sept semaines mise en évidence par TLDAs.

A) L'ensemble des 2^{-ΔΔCt} des miRNAs exprimés dans les cœurs de souris. En rouge est représenté miR-23a et en jaune miR-1 et miR-30a.

B) MiR-23a est sous-exprimé dans les souris *Scn5a*^{+/-}.

C) L'expression de miR-1 et de miR-30a ne montre pas de différences entre les trois groupes d'animaux.

B et C représentent les moyennes des expressions relatives des miRNAs (2^{-ΔCt}) ± sem. Chaque groupe étant composé de six animaux au minimum (test de Kruskal-Wallis, **p < 0,01).

1.2 Etude des miRNAs cardiaques à partir de souris adultes

Dans l'objectif de caractériser l'évolution de l'expression des miRNAs avec l'âge des souris, nous avons étudié les miRNAs présents dans les ventricules gauches de cœurs de souris adultes âgées de vingt-cinq ou de plus de cinquante semaines. Notre étude chez les animaux de plus de cinquante semaines n'a été réalisée que sur des cœurs de souris sauvages ou de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère ». Le phénotype des souris était plus facile à déterminer chez les souris adultes (tableau 5).

Tableau 5: Caractéristiques des animaux adultes.

Animaux	Génotype	Intervalle QRS (en ms)	Phénotype	Âges (en semaines)
B956	sauvage	11	sauvage	27
B965	sauvage	12	sauvage	25
B973	sauvage	11	sauvage	25
B979	sauvage	11	sauvage	24
B978	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	15	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « mineur »	25
B982	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	15	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « mineur »	24
B963	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	15	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « mineur »	26
B969	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	14	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « mineur »	25
B961	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	27	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	26
B971	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	21	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	25
B972	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	20	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	25
B959	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	22	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	26
B847	sauvage	12	sauvage	61
B860	sauvage	10	sauvage	59
B862	sauvage	13	sauvage	59
B868	sauvage	10	sauvage	59
B1026	sauvage	15	sauvage	50
B1028	sauvage	15	sauvage	50
B1027	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	22	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	51
B996	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	24	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	57
B997	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	27	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	57
B846	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	24	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	61
B849	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	25	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	61
B865	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	23	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	59
B867	<i>Scn5a</i> ^{+/-}	24	<i>Scn5a</i> ^{+/-} « sévère »	59

Les miRNAs exprimés dans les cœurs de souris adultes ont été classés en fonction de leur expression relative pour les comparer avec celles obtenues dans les cœurs de souris de sept semaines. Les miRNAs exprimés dans les cœurs adultes sont majoritairement les mêmes que ceux exprimés dans les cœurs de souris de sept semaines (Tableau 5). Toutefois dans les échantillons issus des souris âgées de vingt-cinq semaines, sept nouveaux miRNAs étaient exprimés et six miRNAs n'étaient plus exprimés dans les cœurs de souris très âgées (par rapport aux échantillons des souris âgées de sept semaines). Ces différences résultent du faible niveau d'expression des miRNAs dont leur amplification tardive n'est pas toujours prise en compte dans nos analyses.

Dans les cœurs de souris âgées de vingt-cinq semaines, dix-sept miRNAs avaient une expression relative supérieure à dix et seuls quinze miRNAs étaient fortement exprimés dans les cœurs de souris âgées de plus de cinquante semaines. Quoiqu'il en soit, miR-133a était toujours le miRNA exprimé majoritairement dans les cœurs de souris sauvages et *Scn5a*^{+/-}, âgées de sept, vingt-cinq ou de plus de cinquante semaines (Tableau 6). Nous avons observé une expression croissante de miR-133a et une diminution de l'expression miR-1 dans les cœurs de souris ($(2^{-\Delta Ct})_{miR-133a} = 612 \pm 25$ (n=11) ; $(2^{-\Delta Ct})_{miR-1} = 61,6 \pm 2,6$ (n=11), chez les souris de vingt-cinq semaines et $(2^{-\Delta Ct})_{miR-133a} = 1819 \pm 153$ (n=11) ; $(2^{-\Delta Ct})_{miR-1} = 24,3 \pm 1$ (n=11) chez les souris de plus de cinquante semaines).

Tableau 6: Les miRNAs les plus exprimés dans les cœurs de souris adultes mis en évidence par TLDAs.

A	sauvage		$Scn5a^{+/-}$ « mineur »		$Scn5a^{+/-}$ « sévères »	
	expression moyenne des miRNAs	sem	expression moyenne des miRNAs	sem	expression moyenne des miRNAs	sem
mmu-miR-133a	573	19,68	608	39,32	671	54,80
mmu-miR-126-3p	147	7,81	166	9,23	180	3,80
mmu-miR-133b	103	8,56	106	3,72	111	11,47
mmu-miR-24	70	2,59	76	2,85	88	1,42
mmu-miR-145	60	3,08	65	2,56	64	4,38
mmu-miR-1	56	2,84	65	4,08	64	5,78
mmu-miR-30c	47	3,15	52	2,16	48	5,67
mmu-miR-29a	33	0,85	37	1,62	34	1,59
mmu-miR-30b	33	1,96	33	1,97	33	3,80
rno-miR-1	25	1,29	29	1,67	28	1,61
mmu-miR-191	21	0,55	23	1,45	28	0,86
mmu-miR-19b	21	1,37	20	1,59	23	0,81
mmu-miR-16	18	0,28	19	0,76	21	0,57
mmu-miR-125b-5p	12	0,62	14	0,32	15	0,79
mmu-miR-126-5p	12	0,26	13	0,40	13	0,19
mmu-miR-26a	11	0,58	12	0,62	12	0,77
mmu-miR-100	10	0,62	10	0,56	10	0,05

B	sauvage		$Scn5a^{+/-}$ « sévère »	
	expression moyenne des miRNAs	sem	expression moyenne des miRNAs	sem
mmu-miR-133a	1717	187,93	1942	218,19
mmu-miR-126-3p	237	24,66	286	16,68
mmu-miR-24	197	6,60	238	12,10
mmu-miR-133b	93	8,80	91	7,15
mmu-miR-30c	61	2,55	59	3,83
mmu-miR-16	57	3,89	66	4,19
mmu-miR-191	42	3,70	54	4,43
mmu-miR-30b	35	1,54	34	1,63
mmu-miR-29a	28	0,56	31	1,09
mmu-miR-1	24	1,12	25	1,73
mmu-miR-145	20	0,92	19	0,75
mmu-miR-30e	20	0,79	22	1,36
mmu-miR-150	19	1,47	23	2,09
rno-miR-1	19	0,63	19	0,61
mmu-miR-486	16	1,14	17	1,25

- A) Les dix-sept miRNAs ayant une expression relative ($2^{-\Delta Ct}$) supérieure à dix dans les cœurs de souris de vingt-cinq semaines.
- B) Les quinze miRNAs ayant une expression relative ($2^{-\Delta Ct}$) supérieure à dix dans les cœurs de souris de plus de cinquante semaines. Ce tableau regroupe les moyennes des $2^{-\Delta Ct} \pm$ sem de chaque échantillon de chaque groupe composé au minimum de trois animaux.
- A et B. Aucun de ces miRNAs n'est exprimé différemment entre les trois groupes de souris (test de Kruskal-Wallis).

Nous avons réalisé une analyse de l'expression de l'ensemble des miRNAs en étudiant les valeurs des $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les miRNAs étudiés ne variaient que de $\pm 0,5$ Ct entre les échantillons d'un même phénotype. Nous avons ainsi étudié l'expression de 100 miRNAs chez les souris de vingt-cinq semaines et de 105 miRNAs chez les souris de plus de cinquante semaines. La Figure 27A montre que la majorité des miRNAs étudiés ont une expression qui varie faiblement entre les cœurs de souris sauvages, de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et celles avec un phénotype « sévère », quel que soit l'âge des souris. Toutefois la Figure 27A montre que quelques miRNAs étaient plus exprimés chez les souris *Scn5a*^{+/-} développant des troubles sévères de la conduction. En effet quatre miRNAs, miR-186, miR-339-3p, miR-31 et miR-574-3p étaient significativement sur-exprimés de $62 \pm 5 \%$, de $87 \pm 7 \%$, de $50 \pm 3 \%$ et de $60 \pm 10 \%$ respectivement dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » âgées de vingt-cinq semaines (histogrammes de la Figure 27B). De façon surprenante, seul miR-574-3p était aussi sur-exprimé de $70 \pm 22 \%$, dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} de plus de cinquante semaines développant d'importants troubles de la conduction. Ces souris âgées sous-exprimaient aussi miR-339-5p de $43 \pm 3 \%$ (histogrammes de la Figure 27B).

En revanche miR-23a n'est plus exprimé différemment dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} adultes par rapport aux cœurs de souris sauvages (Figure 28).

Nous avons mis en évidence une sur-expression de miR-574-3p dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} adultes âgées de vingt-cinq et de plus de cinquante semaines avec d'importants troubles de la conduction. MiR-574-3p n'a pas encore de fonction décrite dans la littérature.

Afin d'identifier une cible potentielle de ce miRNA susceptible d'expliquer le phénotype, nous avons consulté les sites de prédiction de fixation d'un miRNA sur des séquences 3'UTR. Trois sites majeurs existent : TargetScan, Microcosm Target et PicTar. TargetScan prédit trois ARNm comme cibles potentielles pour miR-574-3p (Tableau 7). Microcosm Target répertorie toutes les séquences potentielles de fixation de miR-574-3p : 900 séquences sont enregistrées. PicTar n'a pas encore référencé ce miRNA. Nous n'avons retrouvé que deux, la Culline 2 et la NADH Déshydrogénase, des trois ARNm cibles prédits par la base de TargetScan dans la base Microcosm Target.

La Culline 2 est une protéine du complexe d'ubiquitination, il s'agit d'une protéine « scaffold » qui optimise la présentation des substrats à l'ubiquitine ligase E2 (Zheng *et al*, 2002).

La NADH déshydrogénase est un composant essentiel de la chaîne respiratoire qui permet le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone, le gène NDUFA4L2 a été récemment identifié (Andreas *et al*, 2009).

Nous sommes actuellement dans l'étude de ces données pour essayer de trouver un ARNm cible pertinent à étudier.

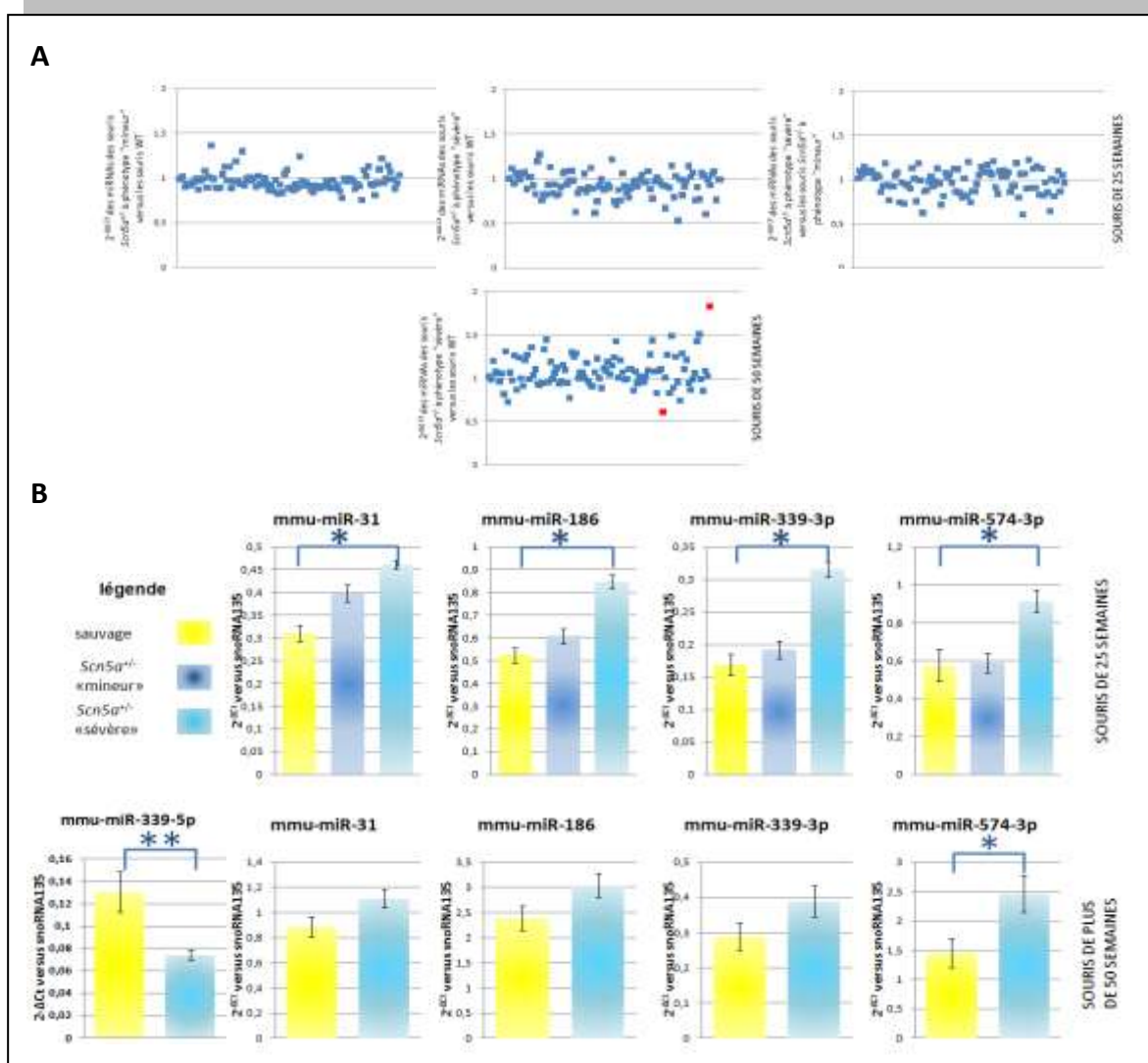


Figure 27: Expression des miRNAs dans les cœurs de souris adultes.

- A) L'ensemble des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ des miRNAs exprimés dans les cœurs de souris adultes de vingt-cinq (en haut) et de cinquante semaines (en bas). En rouge sont représentés miR-574-3p et miR-339-5p.
- B) Les miRNAs différentiels dans les cœurs de souris de vingt-cinq semaines et leur expression dans les cœurs des souris de plus de cinquante semaines. Seul miR-574-3p reste significativement sur-exprimé dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec des troubles de la conduction et miR-339-5p apparaît sous-exprimé dans ces mêmes cœurs.
- B représentent les moyennes des expressions relatives des miRNAs ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm sem. Chaque groupe étant composé de trois animaux au minimum (test de Kruskal-Wallis, **p < 0,01 et *p < 0,05).

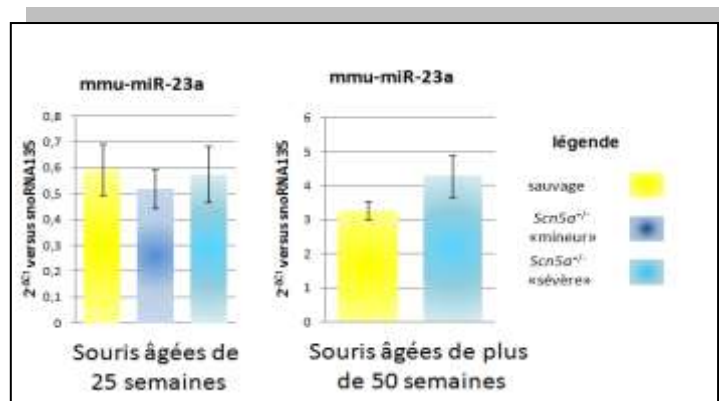


Figure 28 : Expression de miR-23a dans les cœurs de souris adultes.

MiR-23a n'est plus exprimé différemment dans les cœurs des souris *Scn5a*^{+/-} par rapport aux souris sauvages au stade adulte. Représentation des moyennes des expressions relatives des miRNAs ($2^{-\Delta Ct}$) \pm sem. Chaque groupe étant composé de trois animaux au minimum (test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Tableau 7: Cibles de miR-574-3p prédites par le site TargetScan.

Human ortholog of target gene	Gene name	Conserved sites				Poorly conserved sites				Representative miRNA	Total context score
		total	8mer	7mer -m8	7mer -1A	total	8mer	7mer -m8	7mer -1A		
RXRA	Retinoid receptor, alpha X	1	0	1	0	0	0	0	0	mmu-miR-574-3p	-0.28
CUL2	cullin 2	1	0	1	0	0	0	0	0	mmu-miR-574-3p	-0.20
NDUFA4L2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	1	0	1	0	0	0	0	0	mmu-miR-574-3p	-0.14

1.3 Les miRNAs de la fibrose

Les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » développent de la fibrose au cours du vieillissement. Étrangement, nous n'avons pas observé des différences significatives d'expression des miRNAs décrits pour participer au développement de la fibrose telles que miR-21, ou miR-29a, aussi bien dans les souris âgées de vingt-cinq semaines que dans celles âgées de plus de cinquante semaines (Figure 29).

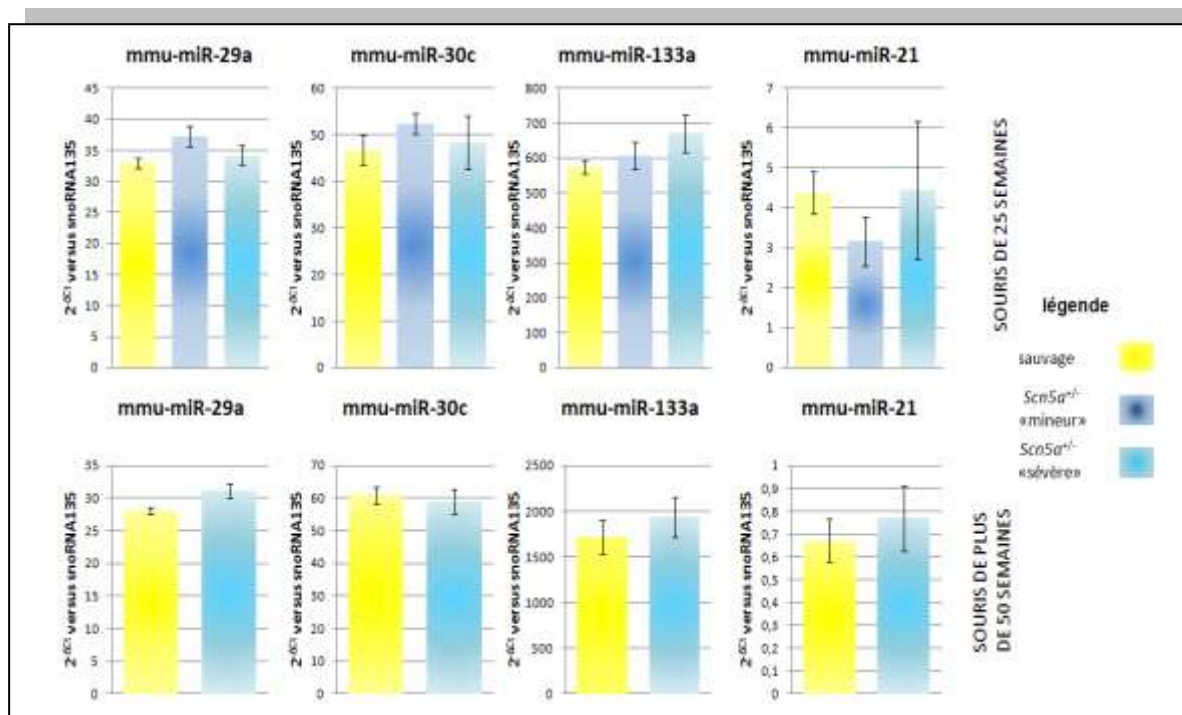


Figure 29 : Expression des miRNAs de la fibrose dans les cœurs de souris adultes.

Les miRNAs décrits dans la fibrose ne montrent pas de différence d'expression entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » et les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et les souris sauvages.

Ici sont représentées les moyennes des expressions relatives des miRNAs ($2^{-\Delta Ct}$) \pm sem. Chaque groupe étant composé de trois animaux au minimum.

Il ressort de cette étude que seules les souris *Scn5a*^{+/-} avec des troubles sévères de la conduction, qui développent aussi avec l'âge une fibrose, expriment différemment des miRNAs. Les souris sauvages et les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur », ont le même profil d'expression des miRNAs.

Les miRNAs exprimés différemment participent soit au développement des troubles de la conduction soit à l'apparition de la fibrose. Ils ne permettent pas d'expliquer la différence initiale de phénotype observée chez les souris *Scn5a*^{+/-}.

2. Discussion

Nous avons pour objectif d'étudier le profil d'expression des miRNAs des souris *Scn5a*^{+/-}, en fonction de leur phénotype afin :

- d'identifier un miRNA (ou des miRNAs) régulant différemment l'expression de Nav1.5 et pouvant nous aider à comprendre la différence de phénotype entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et celles avec un phénotype « sévère »;
- d'identifier des miRNAs associés au développement des troubles de la conduction;
- d'identifier des miRNAs associés au développement de la fibrose.

Notre étude sur les souris *Scn5a*^{+/-} ne nous a pas permis d'identifier un miRNA qui serait susceptible de réguler l'expression de Nav1.5. Cependant, nous avons mis en évidence des miRNAs associés au développement des troubles de la conduction, susceptibles également d'expliquer la fibrose. En effet, seules les souris *Scn5a*^{+/-} développant des troubles sévères de la conduction, associés à l'apparition d'une fibrose au cours du vieillissement, ont un profil de miRNAs différent des souris sauvages. Les autres souris *Scn5a*^{+/-}, avec un phénotype « mineur » et sans fibrose, ont le même profil d'expression de miRNAs que les souris sauvages.

2.1 Utilisation des résultats de TLDA au détriment des puces

Nous avons montré une importante expression de miR-1 dans les ventricules gauches de souris âgées de sept semaines (sauvages et transgéniques).

Les puces Agilent ont mis en évidence deux miRNAs régulés différemment entre les souris sauvages et les souris *Scn5a*^{+/-}. Les puces montraient une légère sur-expression de miR-1 dans les souris *Scn5a*^{+/-} et significative uniquement pour les souris avec des troubles sévères de la conduction. Une faible sous-expression de miR-30a était aussi observable dans les souris *Scn5a*^{+/-}.

Nous avons voulu confirmer ces résultats par PCR quantitative en utilisant la technique *TaqMan* en cartes microfluidiques (TLDA). Nous pouvions ainsi refaire un criblage d'un grand nombre de miRNAs. Nous n'avons pas réussi à confirmer les résultats obtenus avec les puces. Le taux d'expression des miRNAs exprimés dans le cœur n'est pas le même en fonction de la technique. Les analyses par TLDA suggèrent que l'expression de miR-133a serait majoritaire dans le ventricule gauche et que miR-1 ne serait que le sixième miRNA le plus exprimé.

Nous avons étudié simultanément un grand nombre de miRNAs par la technique d'hybridation sur puce (puces Agilent) ou par amplification en temps réel (PCR quantitative *TaqMan* sur cartes microfluidiques d'Applied). Ces techniques ont récemment été comparées et les auteurs ont montré une bonne corrélation entre les résultats obtenus par puce Agilent et ceux obtenus par PCR quantitative (Ach *et al.* 2008; Git *et al.* 2010; Sato *et al.* 2009).

Les puces Agilent sont reconnues pour leur grande spécificité. Ces puces sont en effet composées d'oligonucléotides ne permettant que l'hybridation des miRNAs matures (Git *et al.* 2010). Deux articles récents comparant des puces commerciales ont aussi montré la grande reproductibilité des puces Agilent et leur efficacité dans l'identification de miRNAs différentiellement exprimés (Git *et al.* 2010; Sato *et al.* 2009). Ces puces donnent peu de faux positifs (Git *et al.* 2010). Elles ont en fait une plus faible sensibilité que les autres puces commerciales. Les puces étant de manière générale peu sensibles, les résultats obtenus doivent être validés par une autre technique plus sensible. La technique de PCR quantitative est considérée comme étant la technique d'excellence pour détecter et quantifier l'expression d'un gène. Pour les miRNAs, Applied a développé des amorces pour PCR et des sondes *TaqMan* spécifiques de chaque miRNA mature. Pour s'assurer d'une amplification spécifique, les miRNAs sont rétro-transcrits en ADNc à partir d'une amorce repliée en boucle, ne s'hybridant qu'avec des petits ARNs.

Cette technique est très sensible, ce qui l'amène à produire des faux positifs (Git *et al.* 2010). L'équipe de Ach a montré une absence de corrélation entre les deux techniques pour l'expression de quelques miRNAs. Les auteurs n'expliquent pas cette divergence par une différence de sensibilité entre les deux techniques. Ils remettent en cause les techniques d'isolement des ARNs (Ach *et al.* 2008). Ils montrent une variabilité des résultats en fonction de la préparation des miRNAs. Selon la technique d'extraction utilisée, les miRNAs sont plus ou moins concentrés et les contaminations sont plus ou moins importantes. L'extraction au trizol apporte le plus de contamination, mais toutefois donne des résultats plus reproductibles que les extractions par les kits (Ach *et al.* 2008). Les miRNAs que nous avons étudiés ont été isolés avec du trizol et nous avons utilisé les mêmes échantillons pour réaliser les TLDA et les puces.

Ces études comparatives ont été réalisées à partir de tissus humains ou des lignées cellulaires. L'équipe de Chen, en 2009, a montré une faible corrélation entre des données de puces (de LC Sciences) et des PCR quantitatives sur cartes microfluidiques dans une étude portant sur des myoblastes murins. La technologie des puces utilisées dans cette étude n'est pas la même que celle des puces Agilent. Ces puces donnent plus de faux positifs. Cependant, c'est

l'unique étude qui présente une comparaison avec la technologie *TaqMan* en cartes microfluidiques et sur des cellules murines.

Les sondes utilisées en PCR quantitative ou les oligonucléotides des puces sont peut-être moins spécifiques pour cibler les miRNAs de souris.

Les oligonucléotides synthétisés pour cibler les miRNAs, sont étudiés à la base près pour permettre de différencier les miRNAs d'une même famille⁹. Les amorces de rétro-transcription sont synthétisées pour rétro-transcrire spécifiquement un miRNA. Cependant, pour réaliser les cartes microfluidiques, toutes les amorces sont mélangées, alors qu'elles sont utilisées individuellement pour les essais *TaqMan* individuels. Par ailleurs, nous avons réalisé des tests d'amplification des miRNAs en essais individuels suite à des rétro-transcriptions individuelles ou mélangées et nous n'obtenions pas les mêmes amplifications. Les amorces interagissent peut-être entre elles.

De nombreux articles mettent en relief le manque de référence interne pour l'étude des miRNAs par PCR quantitative. Les résultats des PCR quantitatives sont normalisés avec un petit ARN nucléaire choisi selon son libre arbitre. En fonction de la référence utilisée les résultats ne sont pas les mêmes. Dans l'idéal, il faudrait un miRNA de référence, miRNA « housekeeping ».

Nous n'expliquons pas la différence des résultats obtenus par ces deux techniques et nous ne pouvons pas conclure sur la fiabilité des résultats obtenus par l'une ou l'autre des techniques.

Néanmoins, nous avons décidé de poursuivre notre étude en utilisant la technologie *TaqMan* en cartes microfluidiques, plus sensible.

2.2 L'expression cardiaque de miR-133a et miR-1

MiR-1 est décrit pour être le miRNA majoritaire dans le cœur de souris, représentant 45 % des miRNAs cardiaques (Lagos-Quintana *et al.* 2002). Peu d'articles montrent l'expression différentielle des miRNAs en fonction du tissu chez la souris. Cependant, en 2009, l'équipe de Rao confirmait par puces les résultats obtenus en 2002 par Lagos-Quintana et collaborateurs qui avaient étudié l'expression des miRNAs par Northern-blot (Lagos-Quintana *et al.* 2002; Rao *et al.* 2009). L'expression de miR-133a, quant à elle, est dix fois moins importante (Rao *et al.* 2009). Nous avons retrouvé les mêmes résultats avec les puces Agilent. Nous avons aussi mis en

⁹ Les miRNAs ne se différenciant que de un ou deux nucléotide(s) sont regroupés en famille.

évidence, une forte expression de miR-720. Actuellement, aucune fonction n'est encore attribuée à ce miRNA. Nous n'avons pas pu confirmer la présence de ce miRNA par les cartes *TaqMan* microfluidiques car aucune sonde spécifique de ce miRNA n'était sur nos cartes d'étude. Bien que ce miRNA ne présente pas de différence d'expression entre les souris sauvages et les souris transgéniques, il serait intéressant d'en confirmer l'expression et d'en étudier la fonction cardiaque.

Les résultats de TLDA montrent des résultats opposés. MiR-133a représente le miRNA majoritaire dans les ventricules gauches de souris âgées de sept, vingt-cinq et de plus de cinquante semaines. Les différences observées sont probablement dues aux différentes techniques utilisées. Pour nous assurer de l'expression majeure de miR-133a dans nos échantillons, nous devons réaliser des PCR quantitatives individuelles.

2.3 Sur-expressions de miRNAs dans les souris adultes avec des troubles de la conduction.

Nous avons réalisé nos premières études sur des jeunes souris afin de vérifier si un miRNA est impliqué dans le développement des troubles de la conduction chez les souris *Scn5a*^{+/-} « sévères ». En étudiant des jeunes souris, nous voulions nous affranchir des miRNAs dont les variations d'expression sont secondaires aux troubles de la conduction et à la fibrose qui les accompagne.

Les jeunes souris de sept semaines ont un phénotype qui évolue encore. Pour s'assurer du phénotype des souris nous avons réalisé deux ECGs à une semaine d'intervalle. Le deuxième ECG était parfois différent du premier et a permis de déterminer le phénotype des animaux.

Suite à cette première étude, les TLDA ont montré une sous-expression d'un seul miRNA, miR-23a dans les ventricules gauches des cœurs de souris *Scn5a*^{+/-}, que leur phénotype soit « mineur » ou « sévère », par rapport aux souris sauvages. Ce miRNA ne permet pas d'expliquer la différence de phénotype entre ces souris.

Pour étudier l'évolution de l'expression des miRNAs, nous avons réalisé des TLDA à partir d'échantillons de souris adultes, de vingt-cinq et de plus de cinquante semaines. A ces âges, les souris *Scn5a*^{+/-} ont un phénotype bien marqué, QRS > 20 ms pour les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère »; QRS = 14-15 ms pour les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur », QRS = 10-13 ms pour les souris sauvages.

Les échantillons issus des souris de vingt-cinq et de plus de cinquante semaines montrent respectivement une sur-expression de quatre miRNAs, miR-186, miR-339-3p, miR-31,

et miR-574-3p, et uniquement de miR-574-3p dans les souris *Scn5a*^{+/-} développant des troubles importants de la conduction par rapport aux autres souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype moins marqué et les souris sauvages. Jusqu'à présent, aucun de ces miRNAs n'a une fonction connue dans le cœur.

Nous retrouvons le même profil d'expression de miRNAs dans les ventricules gauches des cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec des troubles de la conduction mineurs et ceux issus des cœurs de souris sauvages. Ces résultats suggèrent que les différences d'expression de miRNAs résultent du développement des troubles de la conduction plutôt que d'une différence de génotype. L'étude des souris de plus de cinquante semaines n'a été réalisée qu'à partir de souris *Scn5a*^{+/-} avec des troubles sévères de la conduction et de souris sauvages.

Ce travail a donc permis de mettre en évidence, par TLDA, la sous-expression d'un miRNA, miR-23a dans les jeunes souris *Scn5a*^{+/-}. Actuellement, nous n'expliquons pas pourquoi ce miRNA est sous-régulé dans les souris *Scn5a*^{+/-}.

Nous n'avons pas observé de modification significative de miR-23a dans les ventricules gauches des souris adultes sauvages et transgéniques âgées de vingt-cinq et de plus de cinquante semaines. Ce miRNA est sous le contrôle du facteur de transcription NFATC3 et est décrit pour être un marqueur précoce de l'hypertrophie (Busk et Cirera 2010).

2.4 La sur-expression de miR-574-3p

Notre travail a permis de mettre en évidence un miRNA sur-exprimé dans les ventricules gauches de souris *Scn5a*^{+/-} développant des troubles sévères de la conduction : miR-574-3p. Nous avons retrouvé ce miRNA sur-exprimé à partir d'échantillons issus de souris de vingt-cinq et de plus de cinquante semaines. Actuellement, ce miRNA n'est pas connu, il a uniquement été identifié par criblage de banques d'ADNc de miRNAs de tissus, de cellules humaines et de cellules murines associés à une analyse bioinformatique (Ahn *et al.* 2010; Landgraf *et al.* 2007; Lui *et al.* 2007). MiR-720 a été identifié par criblage de banques d'ADNc de miRNAs de tissus embryonnaires murins (Mineno *et al.* 2006).

En effet, alors que les premiers miRNAs ont été identifiés par génétique classique, la majorité des miRNAs est aujourd'hui identifiée par criblage de banques de miRNAs obtenues de divers tissus ou par des outils bioinformatiques. Mais pour la majorité des miRNAs identifiés aucune fonction ne leur est attribuée.

MiR-574-3p a été identifié expérimentalement chez l'Homme et la souris. Il a été mis en évidence par criblage de banques de miRNAs isolés entre autres de cellules de rates, de reins et de fibroblastes murins et humains, de cellules d'ovaires embryonnaires de souris et d'une lignée de cancer cervical. Aucune identification n'a été faite dans le cœur (Ahn *et al.* 2010; Landgraf *et al.* 2007; Lui *et al.* 2007). Les outils bioinformatiques ont permis de le localiser sur le chromosome 5 chez la souris et le chromosome 4 chez l'Homme. De la même façon miR-720 a été identifié dans le tissu embryonnaire murin et dans une lignée de neuroblastome humain (Afanasyeva *et al.* 2008; Mineno *et al.* 2006). Ce miRNA est localisé sur le chromosome 3 chez l'Homme et la souris. Nous sommes donc les premiers à identifier l'expression de miR-574-3p et de miR-720 dans le cœur de souris, mais actuellement nous n'avons pas encore identifié leur (s) ARNm cible (s).

Les miRNAs se fixent partiellement en 3'UTR d'ARNm cibles et répriment leur transcription. Mais pour beaucoup d'entre eux, leurs cibles ne sont pas encore connues. Il est donc important d'identifier les ARNm cibles des miRNAs, mais il s'agit d'un travail long et laborieux. Les miRNAs sont des séquences de vingt-deux nucléotides se fixant partiellement à leur ARNm cible, un blast est donc insuffisant pour déterminer des cibles potentielles. Pour aider à l'identification des ARNm cibles, des sites de prédictions ont été développés.

En revanche, lorsque nous avons interrogé ces sites de prédictions, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats. Lorsque TargetScan prédit trois ARNm cibles potentiels pour miR-574-3p, Microcosm répertorie 970 séquences potentielles, parmi lesquelles nous retrouvons les cibles prédites par TargetScan. De même pour miR-720, six cibles sont prédites par TargetScan et 780 séquences par Microcosm. Ces sites ne se basent pas sur les mêmes algorithmes de calculs pour prédire les cibles, ce qui explique pourquoi nous n'obtenons pas les mêmes résultats avec les trois sites.

TargetScan recherche les appariements parfaits de 6-8 nucléotides en 5' du miRNA avec la partie 3'UTR des ARNm cibles. Ces appariements doivent être d'énergie libre la plus faible possible (Lewis *et al.* 2003; Zhang et Verbeek 2010). Microcosm Target (qui utilise l'algorithme MiRanda), favorise aussi les duplex miRNAs-ARNm de faible énergie de liaison, mais n'exige pas une complémentarité parfaite en 5' (Enright *et al.* 2004; Zhang et Verbeek 2010). Ces sites de prédictions, plus particulièrement TargetScan, favorisent aussi les séquences 3'UTR conservées entre les espèces (Zhang et Verbeek 2010). PictaR, un troisième logiciel de prédiction, s'appuie sur la conservation des séquences, mais aussi sur la répétition des sites de fixation dans la partie

3'UTR des potentiels ARNm cibles et la complémentarité des bases en 5' du miRNA, en acceptant toutefois un appariement non parfait (Krek *et al.* 2005).

Ces trois logiciels établis sur trois modes de calculs différents donnent le même taux de faux positifs, soit 30 % (Bentwich 2005; Lewis *et al.* 2003). Ces trois sites semblent donc équivalents et sont à prendre en compte tous les trois. Un croisement des résultats obtenus par les trois logiciels paraît pertinent afin de tester les cibles potentiellement les plus intéressantes (Enright *et al.* 2004). Nous sommes en train de confronter les résultats obtenus avec TargetScan et MiRanda. Afin de cibler un ARNm pertinent pour notre étude, nous nous appuyons sur la bibliographie des potentiels ARNm cibles.

Toutefois, nous devons penser que peut-être l'ARNm réprimé dans notre étude par miR-574-3p, n'est pas présent dans les sites de prédictions. En effet, certaines cibles ne sont présentes dans aucun site de prédictions. MiR-1 et miR-133, n'étaient pas prédits par exemple pour cibler HCN2, qui ne possède qu'un seul site de fixation pour chaque miRNA et ces derniers se lient uniquement par six nucléotides dans leur partie 5' (Luo *et al.* 2008). De même, miR-133 se lie par sa partie centrale à HCN4, ce qui n'est pas pris en compte par les logiciels de prédictions (Luo *et al.* 2008). De plus, récemment il a été montré que les miRNAs peuvent aussi se fixer dans la partie 5'UTR des ARNm, or tous les sites de prédictions ciblent les parties 3'UTR (Kloosterman *et al.* 2004; Lytle *et al.* 2007). Face à cette complexité, nous avons décidé de nous focaliser dans un premier temps sur l'étude de miR-574-3p.

Notre étude est d'autant plus complexe que nous ne savons pas si miR-574-3p régule la conduction cardiaque ou le développement de la fibrose. En effet, nous observons une sur-expression de miR-574-3p dans les souris adultes *Scn5a*^{+/-} avec des troubles sévères de la conduction associés à une fibrose. Les résultats que nous avons pour l'heure ne nous permettent pas de déterminer si cette sur-expression est une conséquence des troubles de la conduction ou un marqueur précoce de la fibrose.

2.5 Les miRNAs de la fibrose

Les souris *Scn5a*^{+/-} avec des troubles sévères de la conduction développent une fibrose péri-vasculaire, visible dès l'âge de seize semaines et qui augmente avec le vieillissement (Royer *et al.* 2005). Au cours du vieillissement, de larges plaques de fibrose de remplacement apparaissent dans le myocarde ventriculaire (Royer *et al.* 2005; van Veen *et al.* 2005). Cette fibrose n'est pas observée chez les souris de seize semaines. Nous ne savons pas par quel mécanisme cette fibrose se met en place. Nos résultats ne montrent pas de différence d'expression entre les souris *Scn5a*^{+/-} ayant un cœur avec de la fibrose et les souris *Scn5a*^{+/-} avec un cœur structurellement sain. Nous n'observons pas de sur-expression de miR-21, décrit pour être exprimé dans les fibroblastes et responsable de l'apparition de la fibrose dans l'hypertrophie myocardique (Thum *et al.* 2008). Il a aussi été montré une sous-expression de miR-29a, après un infarctus du myocarde, dans les cœurs fibreux humains et murins (van Rooij *et al.* 2008). Les miRNAs miR-133a et miR-30c, fortement exprimés dans le cœur, ont aussi été observés sous-régulés dans les cœurs hypertrophiés et fibreux (Duisters *et al.* 2009; Liu *et al.* 2008; Matkovich *et al.* 2010). Un modèle de souris invalidée pour miR-133a développe une forte fibrose (Liu *et al.* 2008). L'équipe de Duisters, dans son travail sur miR-133a et miR-30c dans des cœurs hypertrophiés, suggère que la sous-expression de ces miRNAs n'est pas une conséquence des perturbations du fonctionnement cardiaque, mais participe au développement du remodelage cardiaque et de la fibrose (Duisters *et al.* 2009). Les souris *Scn5a*^{+/-}, développent une fibrose moins fortement prononcée que celle décrite dans les papiers mettant en relief la dérégulation de ces miRNAs (Duisters *et al.* 2009; Matkovich *et al.* 2010; van Rooij *et al.* 2008; Thum *et al.* 2008).

Les mécanismes à l'origine de cette fibrose ne sont pas les mêmes. Ils résultent probablement des troubles sévères de la conduction. Les fibroses décrites dans les papiers décrivant les miRNAs impliqués dans la fibrose, sont étudiées dans des cœurs développant une fibrose suite à une hypertrophie ou un infarctus (Duisters *et al.* 2009; Matkovich *et al.* 2010; van Rooij *et al.* 2008; Thum *et al.* 2008). Les miRNAs décrits dans la fibrose sont peut-être exprimés différemment dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère », mais probablement faiblement, car la fibrose est peu développée par rapport aux fibroses décrites dans la littérature associées à ces miRNAs. De plus, l'équipe de Thum ne détectait pas de variation d'expression de miR-21 aux stades précoces de la fibrose (Thum *et al.* 2008).

MiR-574-3p, sur-exprimé uniquement chez les souris *Scn5a*^{+/-} avec de la fibrose, est peut-être impliqué dans le mécanisme à l'origine de la fibrose. Il est donc important d'identifier la cible de ce miRNA dans les cœurs de souris.

De la même façon, nous n'avons pas observé de différence d'expression des miRNAs décrits dans les troubles de la conduction. Mir-1 a en effet été montré pour réprimer l'expression de protéines importantes dans l'excitabilité des cellules cardiaques : la Cx 43, protéine majeure dans le contact intercellulaire, et Kir2.1, protéine de régulation du potentiel membranaire cardiaque (Yang *et al.* 2007, 2008). Nous n'observons pas de différence d'expression ni de miR-1 dans les cœurs des souris *Scn5a*^{+/-} par rapport aux souris sauvages, ni de miR-133a. MiR-133a a été décrit pour réguler l'expression de ERG, un canal potassique sous-exprimé chez les patients diabétiques suite à une sur-expression de miR-133a. Ces deux miRNAs sont aussi impliqués dans le contrôle de l'automatisme cardiaque. Ils régulent aussi les canaux HCN2 et HCN4 (uniquement miR-1 pour ce dernier).

Aucune modification d'expression des protéines citées ci-dessus n'a été observée dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-}, aussi bien ceux issus des souris avec un phénotype « mineur » que ceux provenant des souris avec un phénotype « sévère » par rapport aux cœurs des souris sauvages (Leoni *et al.* 2010). En effet, les troubles de la conduction observés chez les souris *Scn5a*^{+/-}, résultent en grande partie de la perte d'expression de Nav1.5. Les autres canaux ioniques sont exprimés sans défaut dans les souris *Scn5a*^{+/-}. Cependant un autre facteur est responsable du développement de ces troubles de la conduction et est différemment exprimé entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur » et celles avec un phénotype « sévère ». Actuellement aucun miRNA n'est décrit expérimentalement pour réguler Nav1.5. Toutefois, dans une récente revue, l'équipe de Yang montre un alignement de miR-1 avec *Scn5a* (Yang *et al.* 2008). Nous, nous n'avons pas observé de modification de ce miRNA dans les souris *Scn5a*^{+/-} et par ailleurs lorsque nous utilisons les sites de prédictions nous ne retrouvons pas cet alignement.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les souris *Scn5a*^{+/-} ont la particularité, comme les patients souffrant de la maladie de Lenègre, de développer des troubles de la conduction plus ou moins sévères. Afin de mieux comprendre cette hétérogénéité phénotypique, nous avons étudié le canal Nav1.5, sous un aspect moléculaire et nous avons établi le profil d'expression des miRNAs exprimés dans les cœurs de souris *Scn5a*^{+/-}. Dans un premier temps, nous souhaitions réaliser toutes nos études dans des cardiomyocytes de souris adultes, puis de nouveau-nés. Finalement, devant les difficultés technologiques rencontrées, nous avons dû nous résoudre à étudier la synthèse du canal dans un système de réexpression. Nous avons ainsi pu déterminer, pour la première fois, la demi-vie de Nav1.5.

Les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » ont une expression membranaire de Nav1.5 diminuée, mais nous ne savons pas si cette différence d'expression membranaire résulte d'un défaut de trafic du canal Nav1.5 ou d'une perturbation de sa stabilité membranaire. Nous avons démontré une expression stable de Nav1.5 à la surface des cardiomyocytes dans des conditions non pathologiques. Il serait intéressant de caractériser cette stabilité membranaire de Nav1.5 dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/-}. Notre étude sur l'endocytose du canal Nav1.5 suggère que les canaux Nav1.5 sont stables à la membrane et dégradés rapidement après leur endocytose. On peut imaginer que cette endocytose est accélérée dans les cardiomyocytes des souris *Scn5a*^{+/-} avec d'importants troubles de la conduction. Il serait aussi important de caractériser le temps de trafic des canaux Nav1.5 pour atteindre la membrane plasmique en combinant, par exemple, des expériences de « pulse chase » radioactif et des marquages membranaires à la biotine. Cela pourrait en plus nous permettre de définir les étapes du trafic des canaux Nav1.5 qui sont « perturbées ».

De nombreuses protéines participent au trafic et/ou à la stabilité membranaire de Nav1.5. Ainsi, l'ankyrine G, la dystrophine ou encore la sous-unité β_1 , sont décrites pour participer à l'expression membranaire de Nav1.5, mais leur rôle dans le trafic et/ou la stabilité de Nav1.5 n'est pas encore établi (Mohler *et al.* 2004; Zimmer *et al.* 2002; Gavillet *et al.* 2006). Plus récemment, l' α -actinine 2 a aussi été impliquée dans la stabilisation du canal à la surface des cellules (Ziane *et al.* 2010). L'étude approfondie de l'expression des protéines partenaires de Nav1.5 des souris *Scn5a*^{+/-} devrait nous aider à caractériser leur rôle dans la fonction du canal et le développement du phénotype des souris. Autant il est probable que leurs taux de transcriptions ne sont pas modifiés (Leoni *et al.* 2010) et que les protéines sont correctement synthétisées, autant on peut imaginer qu'en l'absence de la protéine Nav1.5 ces protéines

partenaires sont plus rapidement dégradées ou régulées différemment. L'expression du canal Nav1.5 étant diminuée chez ces souris, les complexes auxquels il appartient sont probablement désorganisés.

Notre étude des miRNAs a mis en évidence une différence d'expression des miRNAs entre les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « sévère » et les souris *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype « mineur ». De prime abord, nous n'avons pas identifié un miRNA régulant spécifiquement Nav1.5 et pouvant expliquer la différence de phénotype des souris *Scn5a*^{+/-} mais cette approche originale a permis de mettre en évidence des miRNAs non encore connus dont toute la caractérisation reste à établir. Nous avons ainsi montré une sous-expression de miR-23a dans les cœurs des souris *Scn5a*^{+/-} jeunes et une sur-expression de miR-574-3p dans les cœurs des souris *Scn5a*^{+/-} adultes avec des troubles sévères de la conduction. Nous devons maintenant essayer de comprendre la différence d'expression de miR-23a dans les cœurs des jeunes souris.

Le rôle de la sur-expression de miR-574-3p dans le développement des troubles de la conduction ou de la fibrose constitue une problématique forte intéressante. Aussi, prévoyons nous d'identifier les cellules dans lesquelles miR-574-3p est exprimé, par PCR quantitative dans des cultures de fibroblastes ou de cardiomyocytes. En effet, miR-574-3p est peut être exprimé dans les cardiomyocytes, comme miR-1 ou miR-133, et/ou dans les fibroblastes, comme miR-21 (Thum *et al.* 2008; Lagos-Quintana *et al.* 2002). Afin de déterminer si ce miRNA participe aux troubles de la conduction ou au développement de la fibrose, nous envisageons d'étudier les effets électrophysiologiques de sa surexpression (par transfection du miRNA) ou de son inhibition (en utilisant des antagomirs) sur des cardiomyocytes isolés ou en co-culture avec des fibroblastes. En parallèle, nous identifierons sa (ses) cible(s) impliquée(s) soit dans le développement des troubles de la conduction ou dans celui de la fibrose.

Il sera important et intéressant d'étudier l'expression de ce miRNA dans d'autres modèles de souris présentant des troubles de la conduction ou de la fibrose voire, de confirmer les observations obtenues chez des patients souffrant de la maladie de Lenègre.

Notre travail a aussi permis de mettre en évidence une forte expression de miR-720 dans le cœur des souris. Nous envisageons de caractériser ce miRNA. Ainsi, dans un premier temps, nous confirmerons l'expression de ce miRNA par PCR quantitative en temps réel, puis nous essaierons de comprendre son rôle dans le cœur et de déterminer dans quel type cellulaire il est exprimé.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en relief des miRNAs exprimés différemment chez les souris avec d'importants troubles de la conduction. Toutefois ces différences d'expression ont été détectées dans les souris adultes et nous ne pouvons pas, pour le moment, préciser s'ils sont précurseurs et participent aux développements des troubles de la conduction ou s'ils en sont la conséquence. Néanmoins, notre étude ouvre de nouvelles perspectives pour déterminer les mécanismes impliqués dans la maladie de Lenègre qui pourront aider à mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques modulant le trafic de Nav1.5 ou l'expression des protéines réprimées par les miRNAs et ainsi limiter le développement des troubles de la conduction et de la fibrose.

MATERIEL ET METHODES

1. Etude de Nav1.5

1.1 Culture cellulaire

1.1.1 Cardiomyocytes adultes

Des souris adultes sont sacrifiées par dislocation cervicale quinze minutes après injection d'héparine. Le cœur est rapidement rincé et monté sur colonne, par son aorte, en moins de cinq minutes après sacrifice. Le cœur est perfusé une minute avec une solution de perfusion avec 1 mM de calcium afin de bien rincer le cœur de tout son sang (les solutions sont regroupées dans les tableaux ci-dessous). Le cœur est rincé ensuite avec la même solution de perfusion sans calcium pendant quatre minutes afin d'arrêter toute activité cardiaque. Le cœur est digéré dix minutes, avec une solution de digestion. Les solutions ont toutes été équilibrées à 37 °C et filtrées avant utilisation, elles sont distribuées par une pompe péristaltique, au débit de 3 ml.min⁻¹.

Le cœur est ensuite dilacéré dans une boîte de Pétri dans 5 ml de solution de digestion. L'ensemble est placé dans un tube Falcon de 50 ml avec 5 ml de la solution 1 d'arrêt de la digestion, à 37 °C, où vingt allers-retours sont délicatement effectués à l'aide d'une pipette de 25 ml. Après dix minutes de sédimentation, la solution est centrifugée une minute à 180 G. Les culots sont resuspendus, délicatement, dans 10 ml de la solution 2 d'arrêt de la digestion. Toutes les dix minutes, du calcium est ajouté afin d'obtenir des concentrations successives de: 0,05 mM ; 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM et 1 mM. Le calcium est homogénéisé en agitant, très délicatement le tube Falcon. Les cardiomyocytes sont précipités par une centrifugation d'une minute à 180 G.

Les cardiomyocytes sont resuspendus dans un milieu d'ensemencement, équilibré à 37 °C et à 5 % de CO₂, et sont ensemencés à raison de 50 000 cellules par boîte de Pétri de 3,5 cm de diamètre. Deux heures avant l'ensemencement, le fond des boîtes de Pétri a été recouvert de laminine diluée à 1.10⁻² X dans du PBS (Phosphate Buffered Saline). Après deux heures d'incubation les boîtes sont rincées trois fois avec 2 ml de PBS. Une heure après ensemencement et incubation à 37 °C à 5 % de CO₂, le milieu d'ensemencement est retiré délicatement et remplacé par le milieu de culture, équilibré à 37 °C et à 5 % de CO₂. Le milieu est ensuite changé toutes les vingt-quatre heures.

Solutions pour les isolements de cardiomyocytes adultes.

Solution de perfusion équilibrée à pH=7,5

Réactifs	Sources	Concentrations
NaCl	Sigma	103 mM
KCl	Sigma	14,7 mM
KH ₂ PO ₄	Sigma	0,6 mM
NaH ₂ PO ₄	Sigma	0,6 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	Sigma	1,2 mM
NaHCO ₃	Sigma	22 mM
HEPES	Sigma	10 mM
Glucose	Sigma	5,5 mM
BDM	Sigma	10 mM
Taurine	Sigma	30 mM

Solution de digestion

Réactifs	Sources	Concentrations
Solution de perfusion à pH=7,5		1X
Trypsine, EDTA	Invitrogen	0,14 mg.ml ⁻¹
libérase blendzyme 1	Roche	0,25 mg.ml ⁻¹
Chlorure de Calcium, CaCl ₂	VWF	12,5 µM

Solution 1 d'arrêt de la digestion

Réactifs	Sources	Concentrations
Solution de perfusion à pH=7,5		1X
Sérum de Veau Foetal, SVF	Invitrogen	10%
Chlorure de Calcium, CaCl ₂	VWF	12,5 µM

Solution 2 d'arrêt de la digestion

Réactifs	Sources	Concentrations
Solution de perfusion à pH=7,5		1X
Sérum de Veau Foetal, SVF	Invitrogen	5%
Chlorure de Calcium, CaCl ₂	VWF	12,5 µM

Milieu d'ensemencement

Réactifs	Sources	Concentrations
Dulbelcco's Modified Eagle Medium, DMEM		1X
Sérum de Veau Foetal, SVF	Invitrogen	5%
BDM	Sigma	10 mM
pénicilline	Invitrogen	100 U.ml ⁻¹
glutamine	Invitrogen	2 mM

Milieu de culture

Réactifs	Sources	Concentrations
Dulbelcco's Modified Eagle Medium, DMEM		1X
Sérum Albumine Bovin, BSA	Invitrogen	100 mg.ml ⁻¹
pénicilline	Invitrogen	100 U.ml ⁻¹
glutamine	Invitrogen	2 mM

*BDM: 2,3-butanedione monoxime, induit un arrêt des battements du cœur, en bloquant directement l'interaction Actine-Myosine de manière rapide et totalement réversible quelques secondes après la reperfusion.

** la libérase blendzyme 1 (Roche) est un mélange d'enzymes de digestion de protéases dont la collagénase. L'activité de ce mélange est reproductible d'un lot à un autre permettant de toujours prendre le même volume et ainsi de diminuer les variations entre les préparations.

1.1.2 Cardiomyocytes néonataux

Dix-huit souriceaux ou sept rats nouveau-nés de un à trois jours sont sacrifiés par décapitation. Les cœurs sont prélevés puis déposés dans une boîte de Pétri avec du DMEM. Les ventricules sont séparés des oreillettes sous loupe binoculaire puis déposés dans une boîte de Pétri avec du HBSS (Hank's Buffered Salt Solution). Sous hotte de culture, les ventricules sont dilacérés et incubés pendant deux minutes avec de la trypsine diluée à 0,25 X dans du PBS. Après retrait de la trypsine, les tissus dilacérés sont placés délicatement dans un système d'agitation avec 5 ml de solution enzymatique filtrée (collagénase de type II à 175 U/ml et de la pancréatine solubilisées dans du HBSS). Le système est mis sous agitation dans un incubateur à 37 °C et à 5 % CO₂, pendant dix minutes. Le surnageant, contenant les cardiomyocytes dissociés, est prélevé doucement et jeté. Les fragments tissulaires sont resuspendus délicatement avec 5 ml de la solution enzymatique et sont remis en agitation pendant dix minutes dans l'incubateur. Le surnageant est cette fois récupéré dans un tube Falcon de 50 ml avec 1 ml de SVF, pour arrêter l'activité enzymatique. Ces cycles de digestion-récupération, sont répétés sept fois (voire huit fois pour les isollements de cardiomyocytes de rats). Au dernier cycle, les débris tissulaires sont repris avec le reste de la solution enzymatique et sont filtrés sur une membrane en nylon avec des mailles de 0,2 µm de diamètre. Le tube Falcon de 50 ml avec les cardiomyocytes est centrifugé cinq minutes à 800 rpm à température ambiante. Le surnageant est jeté. Les cardiomyocytes sont resuspendus avec du milieu de culture pour cardiomyocytes néonataux (DMEM, 5% de SVF, 10% de sérum de cheval, 1 % de pénicilline/streptomycine). Les cardiomyocytes sontensemencés dans trois boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre pendant trente minutes, à 37°C et dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Au cours de ces trente minutes, la grande majorité des fibroblastes adhèrent au fond des boîtes et les cardiomyocytes restent en suspension. Les cardiomyocytes sont alors récupérés, comptés etensemencés sur des boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre « coatées » avec de la laminine. Le fond des boîtes de Pétri a été recouvert de laminine diluée à 1.10⁻² X dans du PBS et après deux heures d'incubation les boîtes ont été rincées trois fois avec 2 ml de PBS. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C et à 5 % de CO₂.

Pour les expériences de biochimie, 700 000 cardiomyocytes sontensemencés par boîte; les cardiomyocytes sont utilisés pendant les deux jours suivant la mise en culture. Après trois jours de culture, les cardiomyocytes se différencient et sont inutilisables.

1.1.3 HEK293FT-Nav1.5

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) sont des cellules non polarisées d'origine rénales. La lignée 293FT est transformée avec l'antigène T du virus SV 40 permettant ainsi une forte expression des plasmides avec un promoteur CMV. Ces cellules ont été transfectées avec de la lipofectamine avec un plasmide pcDNA3 contenant l'ADN de Nav1.5 et un gène de résistance à la Zéocine. Les cellules résistantes à la zéocine ont été sélectionnées et testées en patch-clamp pour vérifier l'intégration de l'ADN de Nav1.5. Les cellules HEK293FT exprimant Nav1.5 sont cultivées dans un milieu de sélection composé de DMEM supplémenté en L-glutamine 1 %, 10 % de SVF, 20 µg/ml de gentamicine et 100 mg/ml de zéocine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37 °C à 5 % de CO₂. Les cellules sont repiquées tous les trois ou quatre jours par dilution au dixième. Ces cellules nous ont été fournies par le Pr. Hugues Abriel (Berne, Suisse).

1.1.4 Transfections

Pour réaliser les transfections, les différentes solutions plasmidiques ont été diluées à 500 ng/µl. Les plasmides sont transfectés avec du Fugene6 (Roche). Pour une boîte de Pétri de 3,5 cm de diamètre, 100 µl de DMEM (non complémenté) + 3 µl de Fugene6 + 2 µg de plasmide sont mélangés dans cet ordre (sans autres mélanges, ni vortex, ni aller-retour à la pipette). Après vingt minutes d'incubation à température ambiante, la solution de transfection est mélangée par trois allers et retours à la pipette, puis est déposée sur les cellules. Les cellules HEK293FT-Nav1.5 ont été transfectées avec le plasmide de la protéine Navβ1 couplée au tag YFP, Navβ1-YFP (YFP est un tag fluorescent dans le vert), ou le plasmide de la protéine CD4 utilisé comme contrôle.

Les cellules sont employées vingt-quatre heures après transfection.

1.2 Biochimie

1.2.1 Extractions protéiques

Les cellules placées sur de la glace sont rincées deux fois avec du PBS froid puis incubées dix minutes avec du tampon de lyse Ripa (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCL (pH 7,5), des détergents: 1 % de Igepal, 0,5 % de déoxycholate de sodium, 0,1% de sodium dodécyl sulfate, SDS) enrichi avec du PMSF à 0,17 mg/ml et des antiprotéases (Roche Complete). Elles sont ensuite décollées avec un grattoir, récupérées, puis incubées trente minutes à 4 °C sous

agitation et centrifugées trente minutes à 12 000 g à 4 °C pour précipiter les fragments non solubilisés.

Après chaque extraction, un aliquot de 10 µl est prélevé pour doser les protéines et un second aliquot de 25 µl est gardé pour un éventuel Western Blot. Le reste des extraits est conservé congelé à -20 °C.

1.2.2 Dosage des protéines

Les concentrations des protéines ont été déterminées avec le kit colorométrique (D/C Biorad), compatible avec de nombreux détergents dont l'Igepal et le déoxycholate.

1.2.3 Immunoprécipitations

Immunoprécipitation de Nav1.5 – Ankyrine G

Les extraits protéiques de cardiomyocytes sont incubés toute la nuit, sous agitation à 4°C, avec 3 µg d'Anticorps Nav1.5 (Alomone ASC-005) ou 6 µg d'Anticorps Ankyrine G (Calbiochem NB20, Neuromab N106/20). Le lendemain matin, des billes d'agarose couplées à la protéine G (GEHealthcare) sont resuspendues dans du tampon de lyse et distribuées dans des tubes Eppendorfs à raison de 30 µl de billes par condition. Les billes asséchées sont resuspendues avec le mélange anticorps-extraits protéiques, puis incubées une heure à 4°C sous agitation. Les immunoprécipitations sont centrifugées une minute à 1000 rpm, pour précipiter les billes de protéines G. Le surnageant, correspondant aux protéines non liées aux billes, est conservé. Les billes sont rincées quatre fois avec 1 ml de tampon de lyse froid. Les protéines sont éluées par du tampon Laemmli 2X (4% SDS, 20 % de glycérol, 200 mM de DTT, 125 mM de tampon Tris (pH 6,8)) et sont dénaturées dix minutes à 95°C.

Immunoprécipitation de Nav1.5 pour le « pulse chase »

✓ Billes recouvertes avec l'anticorps

Des billes aimantées de protéine G (Invitrogen) sont rincées trois fois avec du PBS (à raison de 12,5 µl de billes par condition), les billes sont incubées sous agitation, quarante-cinq minutes à température ambiante avec l'anticorps Nav1.5 (Alomone ASC-005) ou NavPan (Sigma S8809) ou l'anticorps anti-IgG de lapin ou de souris. Elles sont ensuite rincées trois fois avec du PBS enrichi avec 0,1 % de tween. Les billes sont conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation, puis réparties dans les eppendorfs à raison de 12,5 µl de billes par condition. Les billes sont resuspendues avec les lysats protéiques et incubées à 4 °C sous agitation pendant deux heures.

Elles sont ensuite rincées quatre fois en alternant des tampons de lyse contenant 150 mM ou 500 mM de NaCl, en changeant de tube à chaque rinçage. Puis les protéines sont éluées cinq minutes à 50 °C dans du laemmli 1X (2 % SDS, 10 % de glycérol, 100 mM de DTT, 65 mM de tampon Tris (pH 6,8)).

✓ **Saturation des billes de protéine A.**

Pour limiter l'absorption non spécifique de protéines radioactives sur les billes de protéine A ces dernières sont « saturées » préalablement avec des lysats froids (non radioactifs) de cardiomyocytes néonataux. Ainsi les billes aimantées de protéines A (Invitrogen), rincées avec du PBS enrichi avec 0,1 % de tween, sont incubées toute une nuit avec des extraits protéiques de cardiomyocytes néonataux de rats en culture. Elles sont ensuite divisées en deux parties, une partie est incubée quarante-cinq minutes avec l'anticorps Nav1.5 ou des Immunoglobulines de lapin utilisés comme contrôle. Les billes sont ensuite incubées avec les lysats de cardiomyocytes exposés vingt-quatre heures au milieu de culture radioactif (voir plus bas). Les billes couplées avec les anticorps sont rincées avec du PBS, trois fois. Le lysat radioactif est récupéré et incubé avec les billes couplées avec l'anticorps pendant deux heures à 4 °C, sous agitation. Les immunoprécipitations sont rincées quatre fois en changeant de tube à chaque rinçage. Les protéines sont éluées cinq minutes à 50 °C dans du laemmli 1 X (2 % SDS, 10 % de glycérol, 100 mM de DTT, 65 mM de tampon Tris (pH 6,8)).

1.2.4 Western Blot

Les protéines dénaturées sont séparées sur un gel d'acrylamide à 10 %. En fin de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide, deux heures à 100V, à 4 °C sous agitation. Le transfert des protéines est vérifié par coloration des protéines au rouge ponceau. La membrane rincée à l'eau est incubée une heure, sous agitation à température ambiante dans du tampon Tris (TBS) enrichi en Tween avec 5 % de lait écrémé (TBS: 50 mM Tris à pH=7,5, 150 mM NaCl; Tween à 0,1 %) pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. L'anticorps primaire est incubé une nuit à 4 °C. La membrane est rincée trois fois pendant dix minutes avec du TBS-T, puis incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase). La membrane est rincée trois fois pendant dix minutes dans du TBS-T.

L'immunodétection est réalisée grâce au kit de bioluminescence ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech).

Les anticorps primaires sont employés aux concentrations suivantes :

- Ankyrin G (Calbiochem NB20) : 1/30 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5
- Nav1.5 (Alomone ASC-005) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5 ;
- NavPan (Sigma S8809) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5 ;
- Hsp70 (BD TransducLabo 610608) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5 ;
- TfnR (Invitrogen 13-6890) : 1/500 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5 ;
- α -actinine (Sigma A7811) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5 ;
- GAPDH (Santa Cruz sc-32233): 1/10000 pour les cardiomyocytes en culture et les HEK-Nav1.5.

Les anticorps secondaires sont employés au 1/10 000.

1.2.5 « Pulse chase »

Principe

Le « pulse chase » ou marquage métabolique, permet de marquer les protéines synthétisées au cours d'un laps de temps précis avec un isotope radioactif ^{35}S , lié à des acides aminés, la méthionine et la cystéine, puis de suivre la décroissance des protéines néosynthétisées radioactives au cours du temps. Cette technique permet ainsi de calculer la demi-vie d'une protéine.

Les cellules sont placées trente minutes dans un milieu de culture sans méthionine et cystéine, puis incubées quinze minutes à 37 °C (ou plus) avec un milieu enrichi en méthionine et cystéine radioactives. Les protéines synthétisées au cours de ce temps incorporent les acides aminés radioactifs c'est la phase du « pulse ». Les cellules sont alors rincées et incubées avec un milieu froid, enrichi en méthionine et cystéine froides, c'est la phase de « chasse ». Au cours de cette phase de chasse, les protéines sont maturées voire dégradées progressivement. Pour suivre cette évolution, des cellules sont lysées après différents temps de chasse et la protéine d'intérêt est immunoprécipitée. Les protéines immunoprécipitées sont séparées sur gel

d'acrylamide. Les gels sont asséchés et sont placés sous un écran phosphore sensible au rayonnement émis par le ^{35}S présent dans les protéines immunoprécipitées.

Marquage métabolique à la méthionine et à la cystéine ^{35}S .

Les cellules HEK-Nav1.5 sont incubées quinze minutes à 37 °C avec un milieu contenant 50 μCi de ^{35}S , par boîte (mélange de méthionine et cystéine, Labeling Mix, [35S]-, 7MCI, Perkin Elmer). Les cellules sont rincées délicatement avec 4 ml de PBS froid, pendant dix minutes et un deuxième rinçage de cinq minutes. Les cellules sont incubées à 37 °C et à 5 % de CO_2 avec du milieu de chasse, milieu « froid » contenant un excès de 10 mM de méthionine et cystéine, pendant zéro, une, deux, trois, quatre et six heures. Après chaque temps, les cellules sont rincées une fois avec du PBS froid, à 4 °C, puis lysées dans 250 μl de tampon Ripa. Les protéines sont conservées à 4 °C. Tous les lysats récupérés, sont centrifugés et immunoprécipités comme décrit plus haut. Les protéines précipitées sont séparées sur un gel pré-coulé SDS-PAGE 3-8% (Invitrogen). Le gel est rincé dans de l'eau distillée, les protéines sont fixées vingt minutes dans une solution d'acide acétique (10 %), d'éthanol (40 %), puis le gel est rincé quinze minutes dans de l'eau sous agitation manuelle. Le gel réhydraté est asséché pendant deux heures sous aspiration sur un papier Watmann. Le gel asséché est placé au contact d'un écran phosphore. Le signal sur l'écran est lu sur un scanner Typhoon 9410 (GEHealthcare).

Les cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés sont pulsés, une heure dans un milieu avec 250 μCi de ^{35}S ou vingt-quatre heures dans un milieu avec 100 μCi de ^{35}S . Les cellules sont directement rincées au PBS, les protéines extraites et immunoprécipitées avec l'anticorps Nav1.5/Nav-Pan ou les anticorps contrôles Igg-lapin/Igg-souris.

1.2.6 La Biotinilation

Principe (Figure 30)

La biotine imperméante permet de marquer les protéines membranaires, puis ensuite de les isoler grâce à la forte affinité de la biotine pour la streptavidine. Ce marquage membranaire permet de suivre spécifiquement l'évolution des protéines membranaires. La biotine est reliée par un pont disulfure à un groupement ester qui réagit avec les amines primaires par attaque nucléophile. Les groupements ester-S-S-biotines se lient aux protéines membranaires principalement grâce aux lysines extracellulaires. Les cellules lysées sont incubées avec des billes de streptavidine qui lient spécifiquement la biotine. Les protéines précipitées sur les billes sont éluées par scission du pont disulfure par un agent réducteur des ponts disulfures tel que le

dithiothréitol, DTT. Le pont disulfure peut aussi être rompu avant de lyser les cellules. Ainsi, seules les protéines endocytées vont pouvoir être précipitées par les billes de streptavidine.

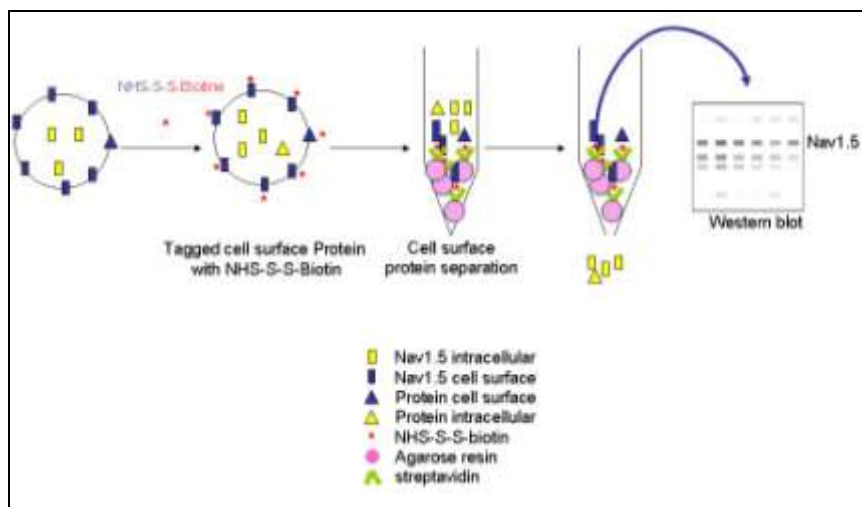


Figure 30 : Schéma du principe de la biotinylation

Protocole

Les cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés, sont rincés cinq minutes avec du PBS, pH 8,4, après douze heures minimum après isolement. Les cellules sont incubées à 4 °C, quinze minutes sous agitation avec 0,5 mg/ml de biotine (NHS-SS-Biotine, ThermoFisher) diluée dans du PBS froid, extemporanément. Les cellules sont rincées deux fois pendant cinq minutes avec du PBS froid, puis elles sont incubées dix minutes avec de la glycine 100 mM, diluée dans du PBS froid. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS froid. Elles peuvent subir d'autres traitements en fonction des objectifs :

✓ Suivi de l'expression des protéines membranaires au cours du temps:

Les cellules sont incubées avec le milieu de culture de cardiomyocytes nouveau-nés à 37 °C pendant zéro, quatre, huit, vingt-quatre et trente heures. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid puis elles sont lysées avec 250 µl de tampon Ripa.

✓ Etude de l'endocytose des protéines membranaires:

Les cellules sont incubées avec le milieu de culture de cardiomyocytes nouveau-nés à 37 °C pendant zéro, dix, quinze et trente minutes et deux, quatre, six, huit, vingt-quatre et trente heures. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid puis elles sont traitées avec un agent réducteur des ponts disulfures, le mesna, pour couper la biotine restée extracellulaire, des protéines marquées au temps t_0 . Trois traitements de vingt minutes avec 100 mM de mesna sont réalisés à 4° C. Le mesna est suspendu extemporanément pour éviter son oxydation, dans une solution de 100 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,6), 1 mM d'EDTA et 0,2 % de BSA. Les cellules

sont ensuite rincées deux fois, à 4 °C avec du PBS, puis elles sont lysées avec 250 µl de tampon Ripa.

Vingt µl des lysats protéiques centrifugés (comme décrit ci-dessus) sont gardés comme référence, correspondant à la fraction totale. Trente µl de billes de streptavidine par condition sont rincées dans un grand volume de tampon de lyse puis réparties et asséchées. Elles sont alors rapidement reprises avec 200 µl d'extraits protéiques (les lysats ne peuvent pas être dosés, car l'albumine de sérum bovin, la BSA, biaise les résultats). Le lendemain, les billes de streptavidine sont centrifugées à 1000 rpm, le premier surnageant est gardé, les billes de streptavidine sont resuspendues avec du tampon de lyse à 500 mM de NaCl et le surnageant est aspiré. Les billes sont reprises avec du tampon de lyse à 150 mM de NaCl: quatre rincages se succèdent en alternant les tampons de lyse avec 500 mM et 150 mM de NaCl. Les protéines biotinilées sont éluées des billes de streptavidine avec du laemmli 2X et elles sont dénaturées dix minutes à 95 °C. Les protéines sont alors prêtes pour un Western Blot.

Pour s'assurer que le marquage est spécifique aux protéines membranaires, on révèle des protéines cytoplasmiques, comme l'actinine ou l'Hsp 70. Nous utilisons le récepteur à la transferrine comme contrôle positif de la biotinylation. Nous comparons les signaux obtenus en biotinylation avec ceux obtenus dans les fractions totales.

Traitement pharmacologique

Pour étudier l'effet de la caséine kinase II sur l'interaction ankyrine G-Nav1.5, nous avons utilisé un inhibiteur de la caséine kinase II, du DMAT (Calbiochem), resuspendu dans du DMSO. La solution de resuspension à 10 mM a été aliquotée en 10 µl et les aliquots étaient conservés à -20°C.

1.3 Analyses d'images et calcul de la demi-vie

L'intensité des signaux de chemiluminescence est captée par une caméra reliée à un ordinateur. Les images sont alors analysables par un logiciel de quantification associé au format des images générées par l'enregistrement de la caméra.

Pour chaque temps de chasse (t_0 à t_4 , en heures) le signal a été quantifié. Grâce au logiciel ImageQuantTL (GE-Healthcare), nous pouvons soustraire directement le bruit de fond présent. Les valeurs obtenues sont rapportées à celle du temps t_0 pour exprimer les résultats en pourcentage de protéines synthétisées à t_0 . Pour calculer la demi-vie de Nav1.5, les valeurs obtenues ont été linéarisées en utilisant la fonction logarithme népérien, \ln . Les résultats suivent

alors une droite dont l'équation est du type $\ln(\%) = bt$, où t est le temps de décroissance. Ainsi, la demi-vie étant le temps nécessaire pour que 50 % des protéines Nav1.5 synthétisées au temps t_0 soient dégradées, l'équation donne : $\ln(0,5) = b t_{0,5}$, où b est la pente de la droite de régression. Cette formule a été appliquée pour le « pulse chase », pour déterminer le temps de demi-vie des protéines synthétisées dans les cellules HEK.

✓ **Calcul de la demi-vie de Nav1.5 à la membrane des cardiomyocytes :**

Pour chaque temps de chasse (t_0 à t_{48} , en heures) le signal a été quantifié, grâce au logiciel ImageQuantTL (GE-Healthcare), nous pouvons soustraire directement le bruit de fond présent. Les valeurs obtenues sont rapportées à celle du temps t_0 pour exprimer les résultats en pourcentage de protéines synthétisées à t_0 . Pour calculer la demi-vie à la membrane des cardiomyocytes de Nav1.5, les valeurs obtenues ont permis de tracer une droite décroissante dont l'équation est du type $(\%) = bt + 1$, où t est le temps de décroissance. Ainsi, la demi-vie étant le temps nécessaire pour que 50 % des protéines Nav1.5 membranaires au temps t_0 soient dégradées, l'équation donne : $(0,5) = b t_{0,5} + 1$, où b est la pente de la droite de régression. Cette formule a été appliquée pour déterminer le temps de demi-vie des protéines Nav1.5 à la membrane des cardiomyocytes.

1.4 Exploitation des résultats

Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes \pm sem.

2. Etudes des miRNAs

2.1 Modèle murin

Toutes les souris sont issues du même fond génétique 129/Sv. Elles ont toutes été génotypées par réaction en chaîne par la polymérase, PCR grâce à trois amorces (Scnint1F, GTTCTTGTGTTCTGTCCGGC; Scnex2R, GGGTGGGTTGCCATAGAGATC; ScnVect1R, GGAAAACCCTGGACTACTGCG).

Les souris hétérozygotes ont un allèle du gène *Scn5a* invalidé par suppression de l'exon 2 (Papadatos *et al.* 2002). Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris sauvages (WT) et hétérozygotes issues des mêmes portées et sacrifiées aux mêmes âges.

2.2 Electrocardiographie des souris *Scn5a*^{+/-}.

Pour phénotyper les souris, des ECGs ont été enregistrés par une technicienne, Agnès Carcouet. L'enregistrement d'un ECG à six dérivations est réalisé sur des souris anesthésiées par injection intra-péritonéale d'etomidate à la dose de 25 mg/kg (Hypnomidate® 2mg/ml, Janssen-Cilag S.A).

Les animaux sont ensuite placés dans une cage de Fraday sur le dos sur un tapis chauffant avec une sonde rectale pour contrôler et maintenir leur température corporelle à un niveau physiologique. Pour obtenir six dérivations, quatre électrodes sous-cutanées de calibre 25 Gauge sont placées au niveau des membres antérieurs et postérieurs de la souris. Lorsque la dérivation D1 est enregistrée seulement deux électrodes sont utilisées, une au niveau de chacun des membres antérieurs. Les enregistrements sont filtrés entre 0,5 et 250 Hz et sont transmis sur un ordinateur via un convertisseur analogique-numérique (IOX 1.585, EMKA Technologies). Un premier enregistrement de base est réalisé quelques minutes après l'anesthésie. Le système nerveux autonome est ensuite bloqué par injection intra-péritonéale d'atropine, antagoniste du système parasympathique, à la dose de 0,5mg/kg (Atropine, 0,5 mg/ml, Lab.Aguettant) et de propranolol, antagoniste du système sympathique, à la dose de 1mg/kg (Avlocardyl® I.V. 5 mg/ml, AstraZeneca). Le blocage du système nerveux autonome permet de normaliser la fréquence cardiaque de la souris et d'obtenir des fréquences cardiaques comparables d'un animal à un autre. En effet, de grandes variations inter-individuelles de la fréquence cardiaque existent dues à une balance sympatho-vagale propre à chaque animal. Dix minutes après blocage du système nerveux autonome, un deuxième enregistrement est réalisé. Un agent pharmacologique peut ensuite être injecté à la souris et un troisième enregistrement sera

effectué généralement dix minutes après injection de celui-ci pour évaluer son effet. Les enregistrements sont analysés grâce au logiciel ECG auto 1.5.12.10 (EMKA technologies, Paris, France). Toutes les mesures sont moyennées sur trois complexes PQRST consécutifs en dérivation 1. Les paramètres mesurés en milli-seconde (ms) sont la durée de l'onde P, de l'intervalle PR, la durée du complexe QRS, de l'intervalle QT et de l'intervalle RR. Les intervalles QRS étaient mesurés du début de l'onde Q jusqu'au point d'intersection de la ligne isoélectrique et du segment STr (Figure 31).

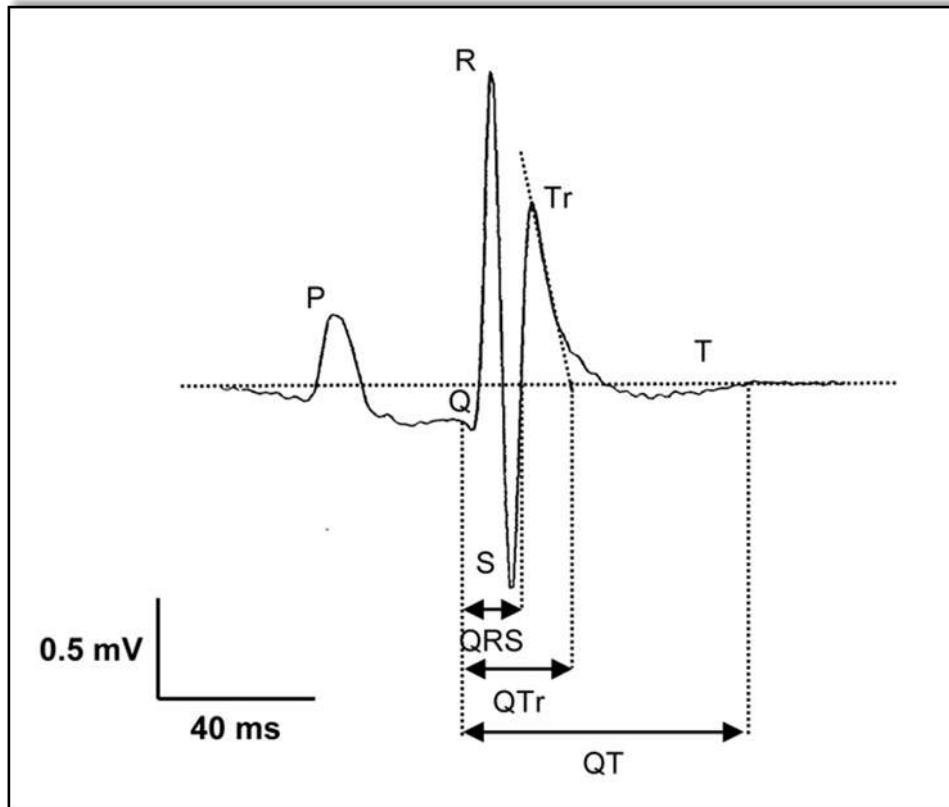


Figure 31 : Paramètres mesurés sur un ECG (Royer *et al.* 2005).

2.3 Préparation des ARNs

Les souris phénotypées et génotypées sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les cœurs sont rapidement prélevés, rincés dans du PBS froid et les oreillettes sont rapidement séparées des ventricules. Seuls les ventricules gauches avec les septums et les ventricules droits sont congelés séparément dans de l'azote liquide. Les tissus sont ensuite conservés à -80°C .

Les ventricules gauches (avec les septums) congelés sont lysés dans 2 ml de trizol avec un polytron sous hotte chimique. Après quinze minutes de centrifugation à 5000 G, à 4°C , les surnageants sont incubés cinq minutes à température ambiante, les culots correspondant aux débris cellulaires sont jetés. 0,4 ml de chloroforme sont mélangés vigoureusement avec les

surnageants. Après une incubation de trois minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé quinze minutes à 12000 G à 4°C, permettant de séparer les phases aqueuses et lipidiques. Les ARNs dans la phase aqueuse, c'est-à-dire la phase supérieure, sont récupérés et mélangés avec 1,2 ml de chloroforme iso-alcoolique. Le mélange alcool et ARNs est bien agité, puis centrifugé une minute à 12000 G à température ambiante. La phase supérieure est récupérée et rincée de nouveau avec 1,2 ml d'alcool iso-alcoolique. La phase aqueuse est ensuite récupérée et mélangée avec 1 ml d'isopropanol, pour précipiter les ARNs. Après dix minutes d'incubation à température ambiante, les tubes sont conservés toute une nuit à -20°C. Le lendemain, les tubes sont centrifugés dix minutes à 12000 G, les surnageants sont aspirés et les ARNs précipités sont rincés avec 1 ml d'éthanol à 75°C et froid. Les ARNs sont centrifugés dix minutes à 4°C, à 12000 G, le surnageant est retiré et les ARNs sont asséchés à l'air libre. Les ARNs sont dissous dans de l'eau RNase free. Un aliquot est utilisé pour le dosage, un autre pour vérifier la qualité des ARNs par puce sur Bioanalyseur, le reste des échantillons est conservé à -20°C.

2.4 Dosage des ARNs

La concentration des ARNs totaux est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (DO 260 nm, NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Les dosages sont effectués en triplicat.

2.5 La qualité des ARNs

La qualité des ARNs totaux isolés, est contrôlée par une technique de microélectrophorèse sur gel d'acrylamide en capillaire (Agilent 2100 Bioanalyser). Seuls les ARNs totaux ayant un nombre d'intégrité (RIN) supérieur à huit sont retenus.

2.6 Les puces Agilent

Dans un premier temps nous avons criblé l'expression des miRNAs par l'utilisation de puces.

2.6.1 Principe des puces Agilent pour étudier les miRNAs

Les puces Agilent (Mouse microRNA Microarrays) permettent d'étudier 567 miRNAs de la souris et dix miRNAs du virus de l'*Herpes* de la souris simultanément. Ces puces sont hybridées avec des oligonucléotides en forme d'épingle à cheveux permettant une hybridation spécifique des petits ARNs (Figure 32A). Pour que toutes les sondes soient de la même efficacité, la surface

d'hybridation est diminuée pour les sondes avec une forte interaction avec leur cible (Figure 32B). Les oligonucléotides sont synthétisés en fonction des séquences des miRNAs enregistrées dans la base de Sanger. Pour certains miRNAs, deux sondes ont été créées. Chaque sonde est présente dix fois au minimum, c'est-à-dire que lorsqu'une seule sonde existe pour étudier un miRNA, sa sonde est représentée vingt fois sur la sonde. Pour permettre une bonne stabilité des complexes formés, une cystéine est ajoutée à chaque extrémité 3' des miRNAs. Cette cystéine est couplée à un fluorophore la cyanine 3 qui permettra de repérer les miRNAs hybridés. La cyanine 3 excitée à 550 nm, fluoresce en vert à 570 nm. Ces puces sont très sensibles, à partir de 100 ng d'ARN total elles peuvent permettre la détection de l'expression d'un miRNA concentré jusqu'à 0,1 aM.

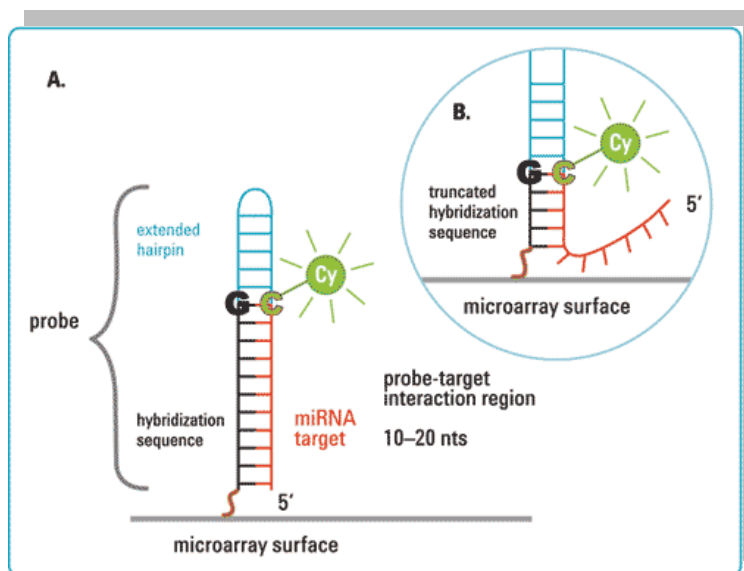


Figure 32 : oligonucléotides hybridés sur lame de verre, puce Agilent (d'après www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-7688en_lo.pdf)

Les puces sont livrées hybridées avec les oligonucléotides. Les échantillons d'ARNs totaux sont utilisés sans préparation particulière. Les ARNs des échantillons issus de cœurs de souris âgées de sept semaines sont dosés, dilués à $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, puis marqués avec de la cyanine 3. Les échantillons sont alors hybridés avec les puces, pendant toute une nuit. Les puces sont ensuite rincées et lues grâce à un scanner. Le principe du scanner est d'exciter les fluorophores fixés sur les sondes par un laser à 532 nm, excitant la cyanine 3, d'amplifier la fluorescence émise par les cyanines excitées à l'aide d'un tube photomultiplicateur et de mesurer puis de convertir en signal électrique et en données chiffrées cette fluorescence.

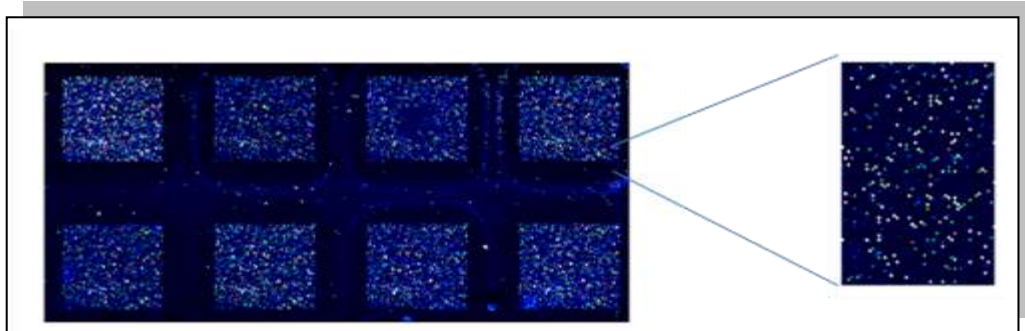


Figure 33 : les signaux obtenus à partir des puces.

Sur une lame sont présentes huit puces différentes (Figure 33), une lame permet donc d'étudier huit échantillons distincts. Chaque point coloré représente la fluorescence de la cyanine 3 liée aux miRNAs, au niveau d'une sonde. Cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de miRNAs hybridés sur la puce. La cyanine émet une fluorescence en verte, mais pour rendre visible les différences d'intensité, celles-ci sont retranscrites en couleurs, le bleu correspond à l'intensité minimale de fluorescence et le rouge à la maximale. La majorité de la puce est bleue, en effet, les miRNAs sont majoritairement faiblement exprimés dans le cœur de souris (voir la partie résultats).

2.6.2 Traitements des données

Les signaux sont localisés et quantifiés par un traitement informatique qui permet de repérer rapidement les sondes n'ayant pas fonctionné (« Feature Extraction » (Agilent technologies))

Les données sont ensuite normalisées. La normalisation a pour objectif de corriger les biais systématiques des données et de supprimer l'influence non biologique sur ces données. Nous avons réalisé une normalisation par « lowess ». Cette normalisation consiste à corriger les signaux liés à la différence de comportement des fluorophores. La correction de ce biais se fait localement pour chaque spot en appliquant un ajustement « Lowess » à l'intensité du signal médian. Le signal de chaque point est ajusté au signal des points qui l'entourent. Cette normalisation faite nous avons supprimé toutes les sondes dont l'intensité de fluorescence était inférieure ou égale à 100 (100 étant l'intensité de fluorescence correspondant au bruit de fond).

Les signaux normalisés peuvent alors être ordonnés par « clustering ». Ce regroupement peut s'effectuer avant une analyse statistique pour visualiser l'ensemble des données ou après une analyse statistique.

Un « clustering » consiste donc à classer des échantillons en fonction de la valeur de fluorescence médiane de chaque sonde dans les différents échantillons (logiciel *Cluster*). Ce logiciel permet aussi de regrouper les sondes et les échantillons ayant le même profil. De ce traitement informatique, des représentations graphiques peuvent être réalisées, dont la carte thermique établie par le programme *Treeview* (Figure 24). Sur ce type de représentation les sondes ayant une intensité de fluorescence inférieure à la valeur médiane sont représentées en vert et celles qui ont une valeur supérieure sont représentées en rouge. Cette représentation graphique de comparaison de l'intensité de fluorescence des sondes pour chaque échantillon, permet de repérer rapidement les miRNAs exprimés différemment entre les différentes conditions.

Les miRNAs mis en évidence par « clustering » ont ensuite été étudiés individuellement. Nous avons regroupé toutes les sondes, analysé les intensités de fluorescence de chacune, puis, calculé la moyenne de l'intensité de fluorescence de chaque sonde pour chaque échantillon.

Pour vérifier nos résultats et refaire un nouveau criblage, nous avons aussi réalisé des amplifications quantitatives suivies en temps réel par la technologie *TaqMan* avec des cartes microfluidiques (ou *TaqMan* Low Density array, TLDA).

2.7 Analyse des miRNAs par TLDA.

2.7.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel.

L'amplification en temps réel des ADNc des miRNAs a été réalisée à l'aide de la technologie *TaqMan* (Applied Biosystems). Les échantillons d'ARNs dosés sont rétrotranscrits en ADNc. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à des couples d'amorces (amorces sens et anti-sens) spécifiques à un gène. Les amplifications sont suivies en temps réel grâce à des sondes *TaqMan*, marquées en 5' par un fluorochrome, FAM et en 3' par un quencher non fluorescent. Ces sondes se positionnent sur l'ADNc amplifié par les amorces. La technologie *TaqMan* repose sur la propriété exonucléasique 5'-3' de la Taq DNA polymérase. A chaque cycle de PCR, la Taq DNA polymérase clive l'extrémité 5' de la sonde *TaqMan* et libère ainsi le fluorochrome. La fluorescence du fluorochrome est alors libérée, car elle n'est plus bloquée par le quencher, et est mesurée à 520 nm. La quantité d'ADN

est doublée à chaque cycle, la fluorescence émise est donc directement proportionnelle à la quantité de produits de PCR synthétisés. Pour étudier les miRNAs, Applied a adapté sa technique en développant des amorces pour rétrotranscription spécifiques à chaque miRNA en forme d'épingle à cheveux. Seuls les petits ARNs peuvent donc se lier à cette amorce assurant ainsi une rétrotranscription spécifique de chaque miRNA (Figure 34). Les ADNc obtenus sont alors amplifiés selon la même technique que les ADNc obtenus à partir d'ARNm.

2.7.2 Les cartes microfluidiques

Les cartes microfluidiques sont composées de 384 puits (Figure 35). Dans chaque puits se trouve un couple d'amorces et une sonde *TaqMan* spécifique d'un miRNA. Les cartes microfluidiques permettent d'étudier 335 miRNAs de souris avec cinq petits ARN contrôles (snoRNA135, snoRNA202, Y1, U87 et MammU6). Avant de réaliser la carte microfluidique, les échantillons sont rétrotranscrits grâce à un mélange d'amorces de rétrotranscription pour les 335 miRNAs de souris et pour les contrôles.

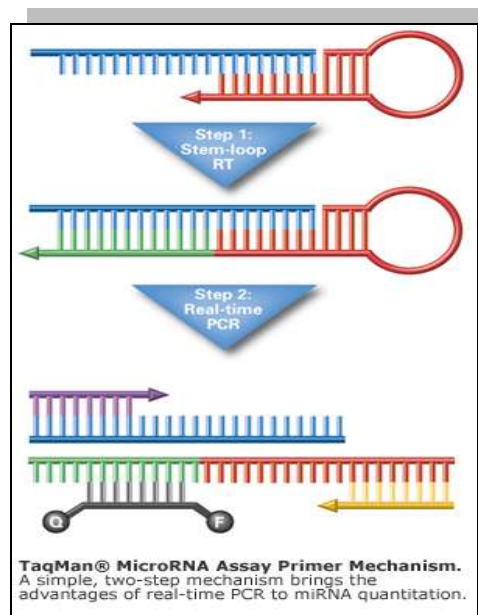


Figure 34 : Rétrotranscription et amplification en temps réel des miRNAs grâce à la technique *TaqMan*.

(www.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_03

[9307.pdf](#))

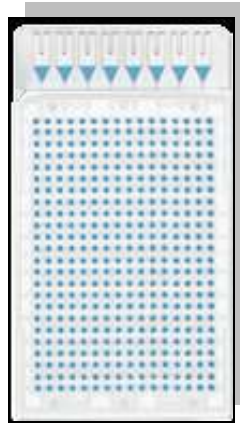


Figure 35 : Carte microfluidique permettant l'analyse simultanée de 335 miRNAs par PCR TaqMan.

A partir de ces amplifications en temps réel, nous cherchons à obtenir l'expression relative des miRNAs par rapport à un petit ARN nucléaire de référence (snoRNA 135). Pour chaque miRNA, le logiciel nous permet de déterminer le Ct, c'est-à-dire le cycle seuil (« threshold cycle »). Le Ct correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre un seuil fixe (« threshold »), situé dans la phase linéaire de la courbe d'amplification. Le Ct du gène x est normalisé par un gène de référence selon la formule $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{référence}$. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans une condition B par rapport à une condition A, selon la formule, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$ (Figure 36). Ces valeurs sont à l'échelle logarithmique de base 2, afin de travailler sur des valeurs en échelle linéaire, nous calculons les $2^{-\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'expression relative d'un gène dans une condition correspond donc au $2^{-\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permet de comparer l'expression d'un miRNA dans une condition par rapport à une autre.

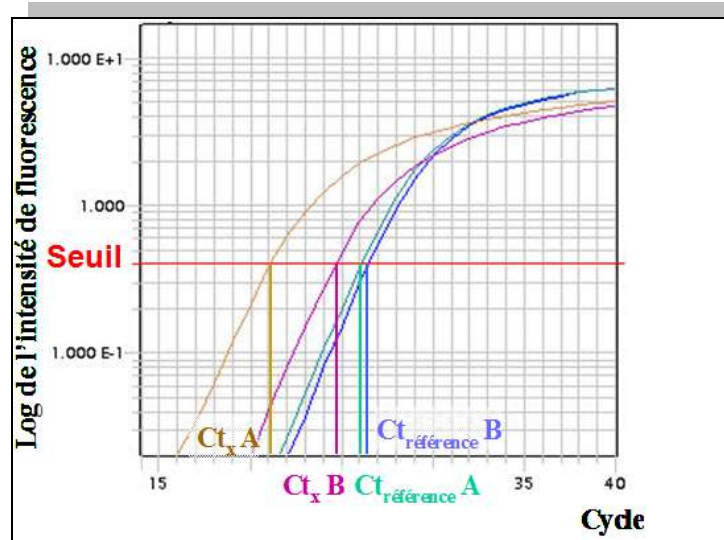


Figure 36 : Courbes d'amplification d'ADNs en temps réel.

2.7.3 Analyse des résultats des TLDA

Les résultats doivent tout d'abord être normalisés. Nous avons choisi la référence en comparant la moyenne des miRNAs les plus exprimés (dont le Ct est inférieur à 32) avec les profils d'expression de chaque contrôle (Figure 37). Le petit ARN nucléaire snoRNA135 est celui qui correspondait le mieux et que nous avons utilisé pour toutes nos analyses. Après normalisation, nous pouvons calculer les $2^{-\Delta Ct}$ et les $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

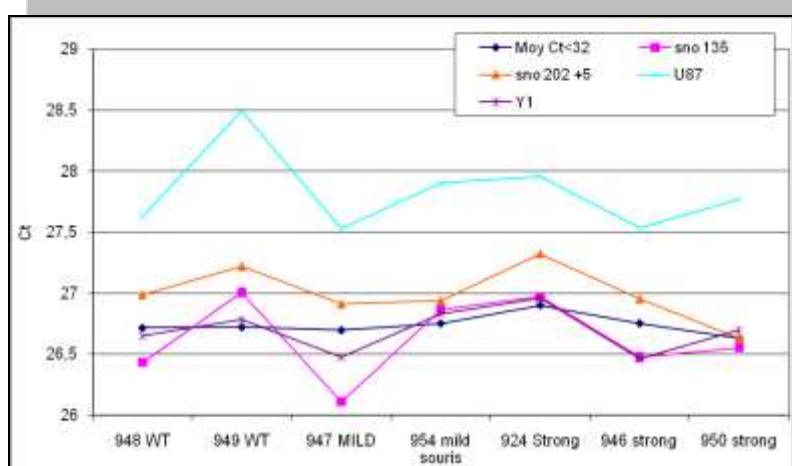


Figure 37 : graphe de comparaison de la moyenne des Ct < 32 avec les Ct des références. Nous avons utilisé le petit ARN nucléaire snoRNA135 comme référence. La moyenne des Ct < 32 s'étale sur 0,2 Ct et la référence snoRNA135 varie de 0,9 Ct entre les échantillons. Pour analyser correctement des PCR quantitatives, il faut que les dépôts soient les plus reproductibles possibles et donc que la moyenne des Ct ne varie pas plus de 1 Ct et de même pour les références.

2.8 Statistiques

Les résultats correspondent aux moyennes des $2^{-\Delta Ct}$ (\pm sem). Pour la comparaison des expressions des miRNAs dans les cœurs de souris de sept et vingt-cinq semaines, les $2^{-\Delta Ct}$ ont été moyennés et soumis à test de Kruskal-Wallis au seuil de 1 ou de 5 % (soit une valeur de $p \leq 0,01$ ou $\leq 0,05$). Pour la comparaison des expressions des miRNAs dans les cœurs de souris de plus de cinquante semaines, les $2^{-\Delta Ct}$ ont été moyennés et soumis à test de Mann et Withney au seuil de 1 ou de 5 % (soit une valeur de $p \leq 0,01$ ou $\leq 0,05$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriel H, Kass RS. 2005.** Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends in Cardiovascular Medicine* **15**: 35-40.
- Abriel H. 2010.** Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**: 2-11.
- Ach RA, Wang H, Curry B. 2008.** Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnology* **8**: 69.
- Afanasyeva EA, Hotz-Wagenblatt A, Glatting K, Westermann F. 2008.** New miRNAs cloned from neuroblastoma. *BMC Genomics* **9**: 52.
- Ahn HW, Morin RD, Zhao H, Harris RA, Coarfa C, Chen Z, Milosavljevic A, Marra MA, Rajkovic A. 2010.** MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Mol. Hum. Reprod.* **16**: 463-471.
- Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, Pérez D, Schott J, Noireaud J, Le Marec H, Mérot J, Escande D, Baró I. 2006.** 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circulation Research* **98**: 1538-1546.
- Ambros V. 2004.** The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**: 350-355.
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. 2010.** Cardiac sodium channelopathies. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **460**: 223-237.
- Amin AS, Meregalli PG, Bardai A, Wilde AAM, Tan HL. 2008.** Fever increases the risk for cardiac arrest in the Brugada syndrome. *Annals of Internal Medicine* **149**: 216-218.
- Anderson ME, Mohler PJ. 2007.** MicroRNA may have macro effect on sudden death. *Nature Medicine* **13**: 410-411.
- Andreas K, Häupl T, Lübke C, Ringe J, Morawietz L, Wachtel A, Sittinger M, Kaps C.** Antirheumatic drug response signatures in human chondrocytes: potential molecular targets to stimulate cartilage regeneration. *Arthritis research & therapy* 2009; **11**(1):R15. Epub 2009 Feb 3.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. 2005.** Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* **111**: 659-670.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu L, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C. 2007.** Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* **115**: 442-449.
- Antzelevitch C. 2006.** Brugada syndrome. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* **29**: 1130-1159.
- Ayalon G, Davis JQ, Scotland PB, Bennett V. 2008.** An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* **135**: 1189-1200.
- Banyasz T, Lozinskiy I, Payne CE, Edelmann S, Norton B, Chen B, Chen-Izu Y, Izu LT, Balke CW. 2008.** Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. *Experimental Physiology* **93**: 370-382.
- Bartel DP. 2004.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. 1998.** Rapid Turnover of Connexin43 in the Adult Rat Heart. *Circulation Research* **83**: 629-635.
- Beinart R, Michailidis A, Gurevitz OT, Glikson M. 2009.** Is flecainide dangerous in long QT-3 patients? *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* **32**: 143-145.

- Bennett ES. 2002.** Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na⁺ channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I. *The Journal of Physiology* **538**: 675-690.
- Bentwich I. 2005.** Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Letters* **579**: 5904-5910.
- Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RHA. 2006.** Approaches to microRNA discovery. *Nature Genetics* **38**: S2-7.
- Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. 1999.** A single Na⁽⁺⁾ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation Research* **85**: 1206-1213.
- Black JA, Newcombe J, Waxman SG. 2010.** Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5. *Brain: A Journal of Neurology* **133**: 835-846.
- Bleil JD, Bretscher MS. 1982.** Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *The EMBO Journal* **1**: 351-355.
- Bouzidi M, Tricaud N, Giraud P, Kordeli E, Caillol G, Deleuze C, Couraud F, Alcaraz G. 2002.** Interaction of the Nav1.2a subunit of the voltage-dependent sodium channel with nodal ankyrinG. In vitro mapping of the interacting domains and association in synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 28996-29004.
- Brackenbury WJ, Chioni A, Diss KJ, Djamgoz MBA. 2007.** The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **101**: 149-160.
- Bréchet A, Fache M, Brachet A, Ferracci G, Baude A, Irondelle M, Pereira S, Leterrier C, Dargent B. 2008.** Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *The Journal of Cell Biology* **183**: 1101-1114.
- Brugada P, Brugada J. 1992.** Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology* **20**: 1391-1396.
- Busk PK, Cirera S. 2010.** MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**: 989-993.
- Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R, Tatsuguchi M, Huang Z, Chen J, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang D. 2009.** MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **119**: 2772-2786.
- Camacho JA, Hensellek S, Rougier J, Blechschmidt S, Abriel H, Benndorf K, Zimmer T. 2006.** Modulation of Nav1.5 channel function by an alternatively spliced sequence in the DII/DIII linker region. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 9498-9506.
- Chagot B, Potet F, Balsler JR, Chazin WJ. 2009.** Solution NMR structure of the C-terminal EF-hand domain of human cardiac sodium channel Nav1.5. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 6436-6445.
- Chauhan VS, Tuvia S, Buhusi M, Bennett V, Grant AO. 2000.** Abnormal cardiac Na⁽⁺⁾ channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circulation Research* **86**: 441-447.
- Chen J, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang D. 2006.** The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics* **38**: 228-233.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. 1998.** Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* **392**: 293-296.

- Chioni A, Brackenbury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MBA. 2009.** A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**: 1216-1227.
- Chioni A, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin GP, Diss JK, Djamgoz MB. 2005.** A novel polyclonal antibody specific for the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel [']neonatal' splice form. *Journal of Neuroscience Methods* **147**: 88-98.
- Choi WS, Khurana A, Mathur R, Viswanathan V, Steele DF, Fedida D. 2005.** Kv1.5 Surface Expression Is Modulated by Retrograde Trafficking of Newly Endocytosed Channels by the Dynein Motor. *Circulation Research* **97**: 363-371.
- Cohen SA, Levitt LK. 1993.** Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circulation Research* **73**: 735-742.
- Colley BS, Biju K, Visegrady A, Campbell S, Fadool DA. 2007.** TRKB increases Kv1.3 ion channel half-life and surface expression. *Neuroscience* **144**: 531-546.
- Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de Groot JR, Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, de Bakker JM. 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.
- Crotti L, Celano G, Dagradi F, Schwartz PJ. 2008.** Congenital long QT syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **3**: 18.
- Cunha SR, Mohler PJ. 2006.** Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovascular Research* **71**: 22 -29.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PEB, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. 2008.** Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* **1**: 209-218.
- Deschênes I, Aroundas AA, Jones SP, Tomaselli GF. 2008.** Post-transcriptional gene silencing of KCHIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **45**: 336-346.
- Deschênes I, Neyroud N, DiSilvestre D, Marbán E, Yue DT, Tomaselli GF. 2002.** Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circulation Research* **90**: E49-57.
- Deutsch C. 2003.** The birth of a channel. *Neuron* **40**: 265-276.
- Do H, Falcone D, Lin J, Andrews DW, Johnson AE. 1996.** The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* **85**: 369-378.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. 2003.** siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development* **17**: 438-442.
- Doench JG, Sharp PA. 2004.** Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* **18**: 504-511.
- Domínguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aránega AE. 2005.** Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovascular Research* **65**: 842-850.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998.** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)* **280**: 69-77.
- Doyle DD, Goings G, Upshaw-Earley J, Ambler SK, Mondul A, Palfrey HC, Page E. 2000.** Dystrophin associates with caveolae of rat cardiac myocytes: relationship to dystroglycan. *Circulation Research* **87**: 480-488.

- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. 2009.** miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation Research* **104**: 170-178, 6p following 178.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. 2004.** MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biology* **5**: R1-R1.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Foeger NC, Marionneau C, Nerbonne JM. 2010.** Co-Assembly of Kv4 {alpha} Subunits with K⁺ Channel Interacting Protein 2 Stabilizes Protein Expression and Promotes Surface Retention of Channel Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Fraser SP, Diss JKJ, Chioni A, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyutürk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC, Djamgoz MBA. 2005.** Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 5381-5389.
- Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, Russo MA. 2005.** Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* **112**: 3680-3687.
- Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M, Wang Z. 2010.** Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncology Reports* **23**: 1293-1299.
- Gavillet B, Rougier J, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr H, Pedrazzini T, Abriel H. 2006.** Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circulation Research* **99**: 407-414.
- Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. 1992.** Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 554-558.
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec J. 2009.** Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 8680-8691.
- Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C. 2010.** Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* **16**: 991-1006.
- Goetz R, Dover K, Laezza F, Shtraizent N, Huang X, Tchetchik D, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Ornitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. 2009.** Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 17883-17896.
- Goldin AL. 2001.** Resurgence of sodium channel research. *Annual Review of Physiology* **63**: 871-894.
- Goldstein RF, Niraj A, Sanderson TP, Wilson LS, Rab A, Kim H, Bebok Z, Collawn JF. 2007.** VCP/p97 AAA-ATPase Does Not Interact with the Endogenous Wild-Type Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**: 706-714.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. 2002.** Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *The Journal of Clinical Investigation* **110**: 1201-1209.

- Grant AO. 2001.** Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *The American Journal of Medicine* **110**: 296-305.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. 2006.** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* **34**: D140-D144.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008.** miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* **36**: D154-158.
- Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JE, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MB. 1995.** Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters* **369**: 290-294.
- Guzadhar L, Pearcey SM, Duehmke RM, Jeevaratnam K, Hohmann AF, Zhang Y, Grace AA, Lei M, Huang CL. 2010.** Atrial arrhythmogenicity in aged Scn5a⁺/KPQ mice modeling long QT type 3 syndrome and its relationship to Na⁽⁺⁾ channel expression and cardiac conduction. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* **460(3)**:593-601.
- Hallaq H, Yang Z, Viswanathan PC, Fukuda K, Shen W, Wang DW, Wells KS, Zhou J, Yi J, Murray KT. 2006.** Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovascular Research* **72**: 250-261.
- Harrell MD, Harbi S, Hoffman JF, Zavadil J, Coetzee WA. 2007.** Large-scale analysis of ion channel gene expression in the mouse heart during perinatal development. *Physiological Genomics* **28**: 273-283.
- Haruta D, Matsuo K, Ichimaru S, Soda M, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Nakashima E, Seto S, Akahoshi M. 2009.** Men with Brugada-like electrocardiogram have higher risk of prostate cancer. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* **73**: 63-68.
- Head CE, Balasubramaniam R, Thomas G, Goddard CA, Lei M, Colledge WH, Grace AA, Huang CL. 2005.** Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in DeltaKPQ Scn5a mice. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **16**: 1329-1340.
- Herbert E, Chahine M. 2006.** Clinical aspects and physiopathology of Brugada syndrome: review of current concepts. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**: 795-802.
- Herfst LJ, Rook MB, Jongasma HJ. 2004.** Trafficking and functional expression of cardiac Na⁺ channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **36**: 185-193.
- Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. 2009.** A Mutation in the β 3 Subunit of the Cardiac Sodium Channel Associated With Brugada ECG Phenotype. *Circulation. Cardiovascular genetics* **2**: 270-278.
- Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. 2007.** Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* **31**: 367-373.
- Isom LL, Catterall WA. 1996.** Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* **383**: 307-308.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BFX, Scheuer T, Catterall WA. 1995.** Structure and function of the β 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**: 433-442.
- Jervell A, Lange-Nielsen F. 1957.** Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American Heart Journal* **54**: 59-68.
- Jespersen T, Gavillet B, van Bemmelen MX, Cordonier S, Thomas MA, Staub O, Abriel H. 2006.** Cardiac sodium channel Nav1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**: 1455-1462.
- Jiang M, Xu X, Wang Y, Toyoda F, Liu X, Zhang M, Robinson RB, Tseng G. 2009.** Dynamic Partnership between KCNQ1 and KCNE1 and Influence on Cardiac IKs Current Amplitude by KCNE2. *The Journal of biological chemistry* **284**: 16452-16462.

- Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA. 2010.** MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS Journal* **277**: 2015-2021.
- Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV. 2000.** The Dominant Negative LQT2 Mutation A561V Reduces Wild-type HERG Expression. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 11241-11248.
- Kang L, Zheng MQ, Morishima M, Wang Y, Kaku T, Ono K. 2009.** Bepridil up-regulates cardiac Na⁺ channels as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity. *British Journal of Pharmacology* **157**: 404-414.
- Karhunen P, Luomanmäki K, Heikkilä J, Eisalo A. 1970.** Syncope and Q-T prolongation without deafness: the Romano-Ward syndrome. *American Heart Journal* **80**: 820-823.
- Kerr NCH, Holmes FE, Wynick D. 2004.** Novel Isoforms of the Sodium Channels Nav1.8 and Nav1.5 Are Produced by a Conserved Mechanism in Mouse and Rat. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 24826-24833.
- Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. 2004.** Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 45004-45012.
- Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. 2004.** Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Research* **32**: 6284-6291.
- Ko S, Lenkowski PW, Lee HC, Mounsey JP, Patel MK. 2005.** Modulation of Na(v)1.5 by beta1-- and beta3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology* **449**: 403-412.
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. 2005.** Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics* **37**: 495-500.
- Kunjilwar K, Strang C, DeRubeis D, Pfaffinger PJ. 2004.** KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 54542-54551.
- Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. 2001.** Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* **104**: 3081-3086.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002.** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology: CB* **12**: 735-739.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller R, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. 2007.** A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* **129**: 1401-1414.
- Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB, Abel PD. 1997.** Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *The American Journal of Pathology* **150**: 1213-1221.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* **23**: 4051-4060.
- Lei M, Zhang H, Grace AA, Huang CL. 2007.** SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovascular Research* **74**: 356-365.

- Leoni A, Gavillet B, Rougier J, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, Schott J, Demolombe S, Bruneval P, Huang CLH, Colledge WH, Grace AA, Le Marec H, Wilde AA, Mohler PJ, Escande D, Abriel H, Charpentier F. 2010.** Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PLoS One* **5**: e9298.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
- Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. 2003.** Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* **115**: 787-798.
- Li G, Sun H, Chen J, Zhou Y, Tse H, Lau C. 2009.** Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS One* **4**: e7307.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005.** Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-773.
- Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li P. 2009.** miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Circulation* **119**: 12103-12108.
- Liu C, Dib-Hajj SD, Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. 2003.** Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 1029-1036.
- Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2008.** microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development* **22**: 3242-3254.
- Lombet A, Lazdunski M. 1984.** Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin gamma. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **141**: 651-660.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC. 2007.** Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* **116**: 2260-2268.
- Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SKG, Lopatin AN, Isom LL. 2007.** Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **43**: 636-647.
- Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. 2008.** Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G-dependent cellular pathway. *The Journal of Cell Biology* **180**: 173-186.
- Lui W, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. 2007.** Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer. *Cancer Research* **67**: 6031-6043.
- Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B, Wang Z. 2008.** Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 20045-20052.
- Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. 2007.** Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions. *Journal of Cellular Physiology* **212**: 358-367.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. 2007.** Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 9667-9672.

- Maier SKG, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA. 2004.** Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* **109**: 1421-1427.
- Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, Ackerman MJ. 2003.** A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circulation Research* **93**: 821-828.
- Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, Schulze-Bahr E, Fukuhara S, Mochizuki N, Makiyama T, Itoh H, Christiansen M, McKeown P, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George AL, Roden DM. 2008.** The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* **118**: 2219-2229
- Malhotra JD, Thyagarajan V, Chen C, Isom LL. 2004.** Tyrosine-phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel β 1 Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 40748 -40754.
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. 1998.** Structure and function of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Physiology* **508 (Pt 3)**: 647-657.
- Marfatia KA, Harreman MT, Fanara P, Vertino PM, Corbett AH. 2001.** Identification and characterization of the human MOG1 gene. *Gene* **266**: 45-56.
- Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Condorelli G, Diwan A, Nerbonne JM, Dorn GW. 2010.** MicroRNA-133a Protects Against Myocardial Fibrosis and Modulates Electrical Repolarization Without Affecting Hypertrophy in Pressure-Overloaded Adult Hearts. *Circulation Research* **106**: 166-175.
- Mazzone A, Strege PR, Tester DJ, Bernard CE, Faulkner G, De Giorgio R, Makielski JC, Stanghellini V, Gibbons SJ, Ackerman MJ, Farrugia G. 2008.** A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 16537-16544.
- Meadows LS, Isom LL. 2005.** Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular Research* **67**: 448-458.
- Meregalli PG, Tan HL, Probst V, Koopmann TT, Tanck MW, Bhuiyan ZA, Sacher F, Kyndt F, Schott J, Albuissou J, Mabo P, Bezzina CR, Le Marec H, Wilde AAM. 2009.** Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society* **6**: 341-348.
- Meregalli PG, Wilde AAM, Tan HL. 2005.** Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovascular Research* **67**: 367-378.
- Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M, Kato I. 2006.** The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Research* **34**: 1765-1771.
- Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. 1998.** Cultured adult cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* **39**: 280 -300.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17533-17538.
- Mohler PJ, Schott J, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song L, Haurogné K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. 2003.** Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**: 634-639.

- Montpetit ML, Stocker PJ, Schwetz TA, Harper JM, Norring SA, Schaffer L, North SJ, Jang-Lee J, Gilmartin T, Head SR, Haslam SM, Dell A, Marth JD, Bennett ES. 2009.** Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16517-16522.
- Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K, Nagayama K. 2000.** Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca²⁺-sensitivity? *Biochemistry* **39**: 1316-1323.
- Murray KT, Hu N, Daw JR, Shin H, Watson MT, Mashburn AB, George AL. 1997.** Functional Effects of Protein Kinase C Activation on the Human Cardiac Na⁺ Channel. *Circulation Research* **80**: 370-376.
- Mycielska ME, Fraser SP, Szatkowski M, Djamgoz MBA. 2003.** Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *Journal of Cellular Physiology* **195**: 461-469.
- Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, Tunsanga K, Kuasirikul S, Malasit P, Tansupasawadikul S, Tatsanavivat P. 1997.** Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation* **96**: 2595-2600.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990.** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* **2**: 279-289.
- Nerbonne JM, Kass RS. 2005.** Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews* **85**: 1205-1253.
- Noda M, Ikeda T, Kayano T, Suzuki H, Takeshima H, Kurasaki M, Takahashi H, Numa S. 1986.** Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* **320**: 188-192.
- Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compennolle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet P. 2001.** Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nature Medicine* **7**: 1021-1027.
- O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. 2007.** Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **357**: 271-296.
- Ou S, Kameyama A, Hao L, Horiuchi M, Minobe E, Wang W, Makita N, Kameyama M. 2005.** Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *The European Journal of Neuroscience* **22**: 793-801.
- Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. 2007.** Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circulation Research* **101**: 703-711.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul J, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC. 2006.** A Common Ankyrin-G-Based Mechanism Retains KCNQ and NaV Channels at Electrically Active Domains of the Axon. *Journal of Neuroscience*. **26**: 2599-2613.
- Pancrazio JJ, Viglione MP, Tabbara IA, Kim YI. 1989.** Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells. *Cancer Research* **49**: 5901-5906.
- Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CL, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. 2002.** Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 6210-6215.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000.** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86-89.

- Peroz D, Dahimène S, Baró I, Loussouarn G, Mérot J. 2009.** LQT1-associated mutations increase KCNQ1 proteasomal degradation independently of Derlin-1. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 5250-5256.
- Peroz D, Rodriguez N, Choveau F, Baró I, Mérot J, Loussouarn G. 2008.** Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *The Journal of Physiology* **586**: 1785-1789.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. 2007.** Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* **17**: 118-126.
- Plummer NW, Meisler MH. 1999.** Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* **57**: 323-331.
- Potet F, Chagot B, Anghelescu M, Viswanathan PC, Stepanovic SZ, Kupersmidt S, Chazin WJ, Balsler JR. 2009.** Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 8846-8854.
- Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J. 2002.** Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* **105**: 1342-1347.
- Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Bloise R, Crotti L, Ronchetti E. 2000.** The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation* **102**: 945-947.
- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. 2003.** Risk stratification in the long-QT syndrome. *The New England Journal of Medicine* **348**: 1866-1874.
- Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu J, Mialet G, Demolombe S, Schott J, Baró I, Escande D, Le Marec H. 2003.** Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *Journal of the American College of Cardiology* **41**: 643-652.
- Probst V, Veltmann C, Eckardt L, Merregalli PG, Gaita F, Tan HL, Babuty D, Sacher F, Giustetto C, Schulze-Bahr E, Borggrefe M, Haissaguerre M, Mabo P, Le Marec H, Wolpert C, Wilde AAM. 2010.** Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation* **121**: 635-643.
- Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE, Rogers JC, Tanada TN, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA. 1995.** Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 25696-25701.
- Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. 2007.** Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **292**: C756-766.
- Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blulloch R. 2009.** Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circulation Research* **105**: 585-594.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901-906.
- Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, van Ginneken ACG, van Brunschot S, Belterman CNW, Wilders R, van Roon MA, Tan HL, Wilde AAM, Carmeliet P, de Bakker JMT, Veldkamp MW, Bezzina CR. 2006.** Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation* **114**: 2584-2594.
- Rivolta I, Abriel H, Tateyama M, Liu H, Memmi M, Vardas P, Napolitano C, Priori SG, Kass RS. 2001.** Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 30623-30630.

- Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM. 1996.** Multiple Mechanisms in the Long-QT Syndrome: Current Knowledge, Gaps, and Future Directions. *Circulation* **94**: 1996-2012.
- Roden DM. 1998.** Mechanisms and management of proarrhythmia. *The American Journal of Cardiology* **82**: 491-571.
- Roden DM. 2008.** Clinical practice. Long-QT syndrome. *The New England Journal of Medicine* **358**: 169-176.
- Roger S, Besson P, Le Guennec J. 2003.** Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1616**: 107-111.
- Roger S, Besson P, Le Guennec J. 2004.** Influence of the whole-cell patch-clamp configuration on electrophysiological properties of the voltage-dependent sodium current expressed in MDA-MB-231 breast cancer cells. *European Biophysics Journal: EBJ* **33**: 274-279.
- Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, Klevit RE. 1999.** Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* **38**: 855-861.
- Romano C. 1965.** Congenital Cardiac Arrhythmia. *Lancet* **1**: 658-659.
- Rosenberg RL, Tomiko SA, Agnew WS. 1984.** Reconstitution of neurotoxin-modulated ion transport by the voltage-regulated sodium channel isolated from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 1239-1243.
- Rougier J, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothélos F, Cordonier S, Staub O, Rotin D, Abriel H. 2005.** Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **288**: C692-701.
- Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Léoni A, 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. 2005.** Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* **111**: 1738-1746.
- Rusconi R, Scalmani P, Cassulini RR, Giunti G, Gambardella A, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Mantegazza M. 2007.** Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Nav1.1 Na⁺ channel mutant. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**: 11037-11046.
- Sætrom P, Heale BS, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. 2007.** Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research* **35**: 2333-2342.
- Saimi Y, Kung C. 2002.** Calmodulin as an ion channel subunit. *Annual Review of Physiology* **64**: 289-311.
- Sakaguchi M. 2002.** Autonomous and heteronomous positioning of transmembrane segments in multispanning membrane protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**: 1-4.
- Sansone V, Griggs RC, Meola G, Ptáček LJ, Barohn R, Iannaccone S, Bryan W, Baker N, Janas SJ, Scott W, Ririe D, Tawil R. 1997.** Andersen's syndrome: a distinct periodic paralysis. *Annals of Neurology* **42**: 305-312.
- Sarao R, Gupta SK, Auld VJ, Dunn RJ. 1991.** Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Research* **19**: 5673-5679.
- Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. 2009.** Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* **4**: e5540.
- Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. 2009.** Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circulation Research* **105**: 523-526.
- Sato Y, Ariyoshi N, Mihara K, Sakaguchi M. 2004.** Topogenesis of NHE1: direct insertion of the membrane loop and sequestration of cryptic glycosylation and processing sites just after TM9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**: 281-287.

- Schmidt JW, Catterall WA. 1986.** Biosynthesis and processing of the alpha subunit of the voltage-sensitive sodium channel in rat brain neurons. *Cell* **46**: 437-444.
- Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. 1999.** Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nature Genetics* **23**: 20-21.
- Schroeter A, Walzik S, Blechschmidt S, Haufe V, Benndorf K, Zimmer T. 2010.** Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49**: 16-24.
- Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M, Kobayashi T, Namiki A, Tohse N. 2003.** Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **58**: 535-548.
- Setoguchi M, Biro S, Miyazato H, Maeda M, Nakao S, Tanaka H. 1993.** Expression and localization of dystrophin in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **194**: 1012-1018.
- Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. 2005.** Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* **112**: 2517-2529.
- Shah VN, Wingo TL, Weiss KL, Williams CK, Balsler JR, Chazin WJ. 2006.** Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3592-3597.
- Shin C, Nam J, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. 2010.** Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular Cell* **38**: 789-802.
- Skach WR. 2009.** Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nature structural and molecular biology* **16**: 606-612.
- Smith P, Rhodes NP, Shortland AP, Fraser SP, Djamgoz MB, Ke Y, Foster CS. 1998.** Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Letters* **423**: 19-24.
- Soldovieri MV, Castaldo P, Iodice L, Miceli F, Barrese V, Bellini G, del Giudice EM, Pascotto A, Bonatti S, Annunziato L, Tagliatela M. 2006.** Decreased Subunit Stability as a Novel Mechanism for Potassium Current Impairment by a KCNQ2 C Terminus Mutation Causing Benign Familial Neonatal Convulsions. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 418-428.
- Stocker PJ, Bennett ES. 2006.** Differential sialylation modulates voltage-gated Na⁺ channel gating throughout the developing myocardium. *The Journal of General Physiology* **127**: 253-265.
- Stokoe KS, Thomas G, Goddard CA, Colledge WH, Grace AA, Huang CL. 2007.** Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of Scn5a+/Delta murine hearts modelling long QT syndrome 3. *The Journal of Physiology* **578**: 69-84.
- Studenik CR, Zhou Z, January CT. 2001.** Differences in action potential and early afterdepolarization properties in LQT2 and LQT3 models of long QT syndrome. *British Journal of Pharmacology* **132**: 85-92.
- Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, Anderson ME, Balsler JR. 2002.** A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* **415**: 442-447.
- Tfelt-Hansen J, Winkel BG, Grunnet M, Jespersen T. 2010.** Inherited cardiac diseases caused by mutations in the Nav1.5 sodium channel. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **21**: 107-115.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. 2008.** MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **456**: 980-984.

- Tian X, Yong SL, Wan X, Wu L, Chung MK, Tchou PJ, Rosenbaum DS, Van Wagoner DR, Kirsch GE, Wang Q. 2004. Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovascular Research* **61**: 256-267.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. 2008. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9355-9360.
- Valdivia CR, Medeiros-Domingo A, Ye B, Shen W, Algiers TJ, Ackerman MJ, Makielski JC. 2010. Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel β 3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovascular Research* **86**: 392-400.
- Valdivia CR, Ueda K, Ackerman MJ, Makielski JC. 2009. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **297**: H1446-1452.
- van Bemmelen MX, Rougier J, Gavillet B, Apothéoz F, Daidié D, Tateyama M, Rivolta I, Thomas MA, Kass RS, Staub O, Abriel H. 2004. Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation Research* **95**: 284-291.
- van Rooij E, Olson EN. 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 2369-2376.
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 13027-13032.
- van Veen TA, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CL, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JM, van Rijen HV. 2005. Impaired Impulse Propagation in Scn5a-Knockout Mice: Combined Contribution of Excitability, Connexin Expression, and Tissue Architecture in Relation to Aging. *Circulation* **112**: 1927-1935.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. 2006. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* **114**: 2104-2112.
- Vohra J. 2007. The Long QT Syndrome. *Heart, Lung & Circulation* **16 Suppl 3**: S5-12.
- Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. 2006. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *The Journal of Clinical Investigation* **116**: 3127-3138.
- Wang J, Ou S, Wang Y, Kameyama M, Kameyama A, Zong Z. 2009. Analysis of four novel variants of Nav1.5/SCN5A cloned from the brain. *Neuroscience Research* **64**: 339-347.
- Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, Schwartz PJ, Keating MT. 1995. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Human Molecular Genetics* **4**: 1603-1607.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. 1995. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**: 805-811.
- Ward CL, Kopito RR. 1994. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 25710-25718.
- Ward OC. 1964. A new familial cardiac syndrome in children. *Journal of the Irish Medical Association* **54**: 103-106.

- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott J, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld ACP, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann H, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AAM, Roden DM, Bezzina CR. 2008.** Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *The Journal of Clinical Investigation* **118**: 2260-2268.
- Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. 2007.** Computational methods for microRNA target prediction. *Methods in Enzymology* **427**: 65-86.
- Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, Angelilli A, Villanueva F, McNamara DM, London B. 2002.** Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* **105**: 707-713.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. 1992.** A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10910-10914.
- Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M. 2008.** Alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* **1**: 193-201.
- Wu L, Yong SL, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz CA, Rho H, Ke T, Szafranski P, Jones SW, Chen Q, Wang QK. 2008.** Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 6968-6978.
- Wu WKK, Li GR, Wong HPS, Hui MKC, Tai EKK, Lam EKY, Shin VY, Ye YN, Li P, Yang YH, Luo JC, Cho CH. 2006.** Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in proliferation of gastric epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* **207**: 437-444.
- Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, Zhang Y, Yang B, Wang Z. 2007.** MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 12363-12367.
- Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z. 2007.** Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *Journal of Cellular Physiology* **212**: 285-292.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. 2007.** The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine* **13**: 486-491.
- Yang B, Lu Y, Wang Z. 2008.** Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovascular Research* **79**: 571-580.
- Yarbrough TL, Lu T, Lee H, Shibata EF. 2002.** Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circulation Research* **90**: 443-449.
- Yong SL, Ni Y, Zhang T, Tester DJ, Ackerman MJ, Wang QK. 2007.** Characterization of the cardiac sodium channel SCN5A mutation, N1325S, in single murine ventricular myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**: 378-383.
- Yoon J, Ho W, Kim S, Cho H. 2009.** Constitutive CaMKII activity regulates Na⁺ channel in rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **47**: 475-484.
- Young KA, Caldwell JH. 2005.** Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *The Journal of Physiology* **565**: 349-370.
- Yu FH, Catterall WA. 2003.** Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* **4**: 207.

- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R. 2003.** Sodium Channel β_4 , a New Disulfide-Linked Auxiliary Subunit with Similarity to β_2 . *Journal of Neuroscience* **23**: 7577-7585.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. 1999.** A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**: 537-548.
- Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu Y, Ackerman MJ, Vincent GM. 2005.** Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 mutations: characteristic T-U-wave patterns predict the KCNJ2 genotype. *Circulation* **111**: 2720-2726.
- Zhang Y, Verbeek FJ. 2010.** Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies. *Journal of Integrative Bioinformatics* **7**.
- Zhang Z, Li Q, Liu C, Wang H, Wang Q, Bao L. 2008.** The voltage-gated Na⁺ channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the β_3 subunit. *Journal of Cell Science* **121**: 3243-3252.
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. 2005.** Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**: 214-220.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koeppe DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP. 2002.** Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703-9.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. 1998.** AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *The Journal of Cell Biology* **143**: 1295-1304.
- Zhou J, Shin H, Yi J, Shen W, Williams CP, Murray KT. 2002.** Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circulation Research* **91**: 540-546.
- Zhou Y, Wang S, Zhu W, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao R. 2000.** Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **279**: H429-436.
- Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. 2010.** Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry* **49**: 166-178.
- Zimmer T, Benndorf K. 2002.** The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the β_1 subunit. *The Journal of General Physiology* **120**: 887-895.
- Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, Benndorf K. 2002.** The β_1 subunit but not the β_2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *The Journal of Membrane Biology* **186**: 13-21.
- Zimmer T, Biskup C, Dugarmaa S, Vogel F, Steinbis M, Böhle T, Wu YS, Dumaine R, Benndorf K. 2002.** Functional expression of GFP-linked human heart sodium channel (hH1) and subcellular localization of the α subunit in HEK293 cells and dog cardiac myocytes. *The Journal of Membrane Biology* **186**: 1-12.
- Zimmer T, Surber R. 2008.** SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **98**: 120-136.

Sites internet

Agilent.2010.le principe des puces appliquées à l'étude de l'expression des miRNAs
http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-7688en_lo.pdf)

Applied.2010.le principe des TLDA's appliquées à l'étude de l'expression des miRNAs
 (http://www.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039307.pdf)

Microcosm Target.2010. site de prédiction des ARNm cibles des miRNAs. <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>.

miRbase.2010. site de recensement des miRNAs. <http://www.mirbase.org/>

PicTar.2010. site de prédiction des ARNm cibles des miRNAs. <http://pictar.mdc-berlin.de/>

TargetScan.2010. site de prédiction des ARNm cibles des miRNAs. <http://www.targetscan.org/>

Thèse

Peroz David. Dégradation du canal KCNQ1 dans le syndrome du QT long. Nouveaux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A. 2008. Université de Nantes.



ANNEXE : LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE

Valorisation des compétences des docteurs « un nouveau chapitre de la thèse »®

Anne Bourgé

*Ecole doctorale : Ecole doctorale 502, Biologie-Santé.
Université de rattachement : Université de Nantes
Mentor : Sophie Bellec*

Etude de l'implication d'une protéine dans les troubles de la conduction cardiaque.



Date probable de présentation orale du « NCT » : juin 2010
Sujet académique de la thèse :
Directeurs de thèse : Dr. Flavien Charpentier, Dr. Jean Mérot
Date probable de soutenance de la thèse : octobre 2010

ANALYSE DU TRAVAIL DE THESE

Cadre général et enjeux du travail de thèse

Présentation succincte

Le travail de ma thèse a consisté à étudier une protéine cardiaque essentielle pour la contraction du cœur. En effet, cette protéine est montrée déficiente dans de nombreuses pathologies cardiaques pouvant conduire à une mort subite.

La mort subite est responsable de 5 à 10 % des décès par an en France. La mort subite est une résultante de problèmes cardiaques souvent non décelés au préalable. L'étude de l'évolution du rythme cardiaque peut permettre d'identifier les patients à risques. Dans certains cas, ces troubles du rythme ont une origine héréditaire, c'est-à-dire liés à des mutations génétiques transmises de génération en génération.

Dans plusieurs familles souffrant de troubles de la conduction, la protéine Nav1.5 a été trouvée modifiée. Ces modifications sont à l'origine de plusieurs maladies, dont la maladie de Lenègre qui se caractérise par des troubles progressifs du contrôle des battements du cœur. Cette maladie touche environ 3% de la population de plus de 50 ans et aucun traitement préventif n'existe pour le moment. Elle est dépistée par électrocardiogramme (ECG), il s'agit d'un examen qui mesure l'activité cardiaque. Lorsque des troubles de l'activité cardiaque apparaissent chez les patients, pour l'heure, le seul traitement existant pour leur éviter une mort subite, consiste à l'implantation d'un stimulateur cardiaque (ou encore appelé pacemaker).

Afin de développer de nouveaux outils de diagnostic et de soin, nous essayons actuellement de mieux comprendre cette maladie et plus particulièrement le rôle de la protéine mutée, Nav1.5, dans cette pathologie.

Toutefois, avant d'étudier la protéine dans un contexte pathologique, nous devons mieux cerner son rôle dans un cœur sain. Nous devons établir l'étude fondamentale de la protéine, c'est-à-dire connaître son mode de vie.

Une protéine a en effet une vie (figure 1), elle résulte de l'expression d'un gène, présent dans le noyau de la cellule. Elle est ensuite synthétisée dans le cytoplasme, puis elle est ensuite dirigée dans la cellule à un lieu spécifique où elle exerce son action.

La protéine que j'ai étudiée, Nav1.5, joue son rôle à la membrane cellulaire. Mon travail a donc consisté :

- à déterminer par quels moyens et en combien de temps la protéine arrive à la membrane après sa synthèse.
- à définir les conditions de son maintien à la membrane et son temps de vie.

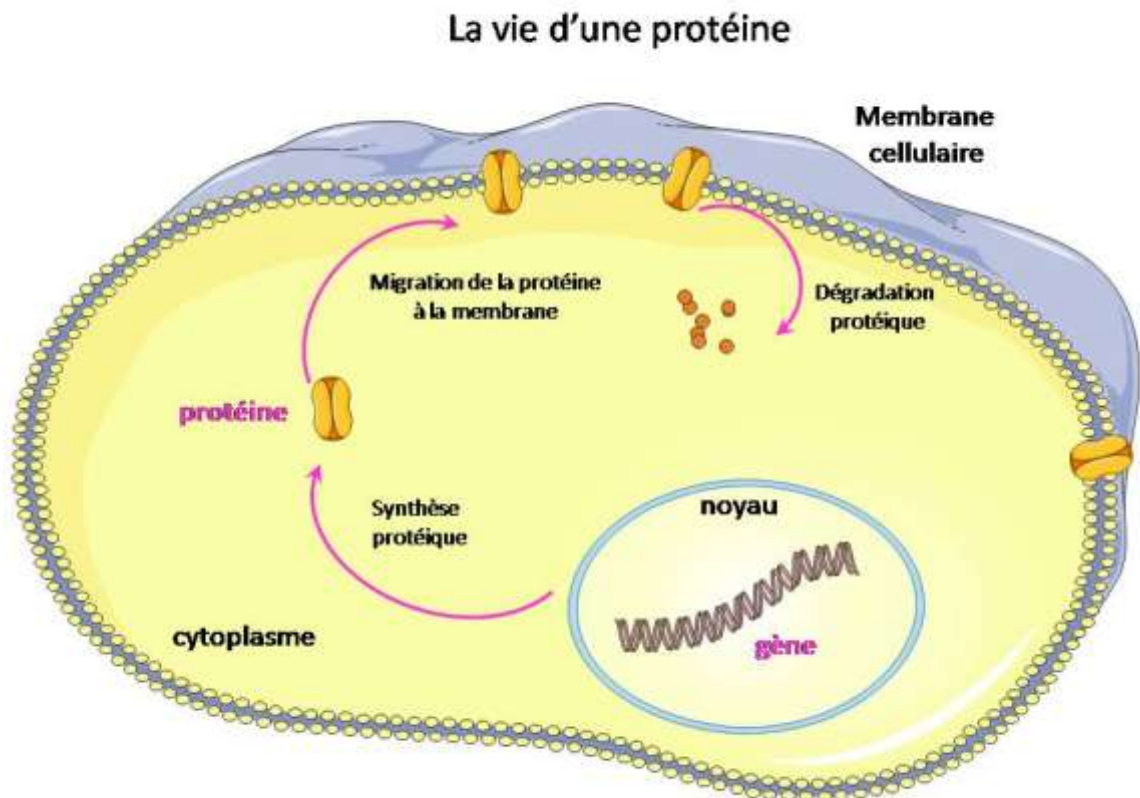


Figure 1 : synthèse d'une protéine à partir de l'expression d'un gène.

La thèse dans son contexte

Présentation de l'unité.

J'ai effectué ma thèse à Nantes, au sein de l'unité de recherche de l'institut du thorax. Cet institut, fondé en 2004, est dirigé par le Pr. Hervé Le Marec et regroupe plus de 800 employés. L'institut constitue un des 5 centres de recherche et de soins en France. En effet, celui-ci est composé de 2 unités :

- une unité de soins, regroupant les praticiens hospitaliers, dirigée par le Pr. Daniel Duveau ;
- une unité mixte de recherche, Inserm U915, dirigée par le Pr. Pierre Pacaud.

L'institut est principalement reconnu dans le monde pour ses travaux sur les troubles du rythme cardiaque. La force de l'institut est de regrouper dans une même structure des spécialistes avec des compétences complémentaires, permettant ainsi d'établir des études complètes et approfondies centrées sur les relations gène-protéine dans les pathologies cardiovasculaires, dans l'objectif d'établir des nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

Une unité de recherche dynamique

L'unité de recherche a publié 92 papiers en 2009 et en a déjà 30 en 2010. L'U915 est une unité dynamique qui s'agrandit tous les mois. Elle s'investit dans de nombreux projets locaux mais aussi internationaux.

A un niveau local....

L'unité est un membre actif de l'institut fédératif¹⁰ de recherche de Nantes, l'IFR26, par lequel l'unité a mis en place une plateforme de séquençages, une autre de génomique et bioinformatique et une plateforme d'exploration fonctionnelle cardiovasculaire du petit animal (comme la souris ou le rat). Ces plateformes nationales facilitent le développement de collaborations.

¹⁰ Les IFRs réunissent des unités de recherche autour d'une stratégie scientifique commune d'excellence. Les unités regroupées mettent en commun leurs moyens intellectuels et matériels pour développer des projets scientifiques fédérateurs.

..mais aussi international

L'unité a des collaborateurs un peu partout en France, principalement à Paris, Marseille, Rennes, Bordeaux, Angers... mais l'institut a aussi une renommée internationale. De nombreuses publications sont produites en collaboration avec des équipes américaines mais aussi européennes. Par ailleurs, l'unité a réuni, via un réseau européen informel sur les arythmies cardiaques, les universités de Cambridge, d'Utrecht, de Muenster et de Munich. Deux réseaux d'excellence transatlantique, financés par la fondation Leducq¹¹, sont coordonnés par l'unité.

Composition de l'unité

L'unité se découpe en 3 grandes équipes :

- l'équipe I, Cardiopathies et mort subite, dirigée par le Dr. Flavien Charpentier ;
- l'équipe II, Risques vasculaires, dirigée par la Dr. Gervaise Loirand ;
- l'équipe III, Génomique et Biothérapies ;
- et 2 équipes AVENIRs, une portée sur les pathologies respiratoires et la deuxième spécialisée sur les variations génétiques touchant les maladies cardiaques.

J'ai réalisé ma thèse dans l'équipe I, encadrée par les Dr. Flavien Charpentier et Jean Mérot. L'équipe est spécialisée dans l'étude moléculaire des maladies cardiaques rares et plus particulièrement, des maladies se développant avec l'âge. L'hypothèse de l'équipe est que la mort subite résulte d'interactions entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux comme les médicaments.

Actuellement l'équipe développe 3 grands projets :

- 1) L'étude des troubles de la conduction cardiaque se développant avec l'âge et d'origine génétique, grâce à un modèle de souris transgéniques, les souris *Scn5a*^{+/-}, c'est-à-dire des souris avec une modification pour le gène *Scn5a* rendant la protéine Nav1.5 non fonctionnelle (protéine essentielle pour le bon fonctionnement du cœur).

¹¹ La fondation Leducq, est une fondation privée qui finance des projets de recherche sur les maladies cardiovasculaires ou neurovasculaires, en collaboration, pendant plus de 5 ans avec des équipes d'Amérique du Nord. Les financements peuvent dépasser les 6.000.000€.

Nos objectifs sont

- d'identifier des marqueurs biologiques pour diagnostiquer précocement le risque de développer ces troubles ;
 - de comprendre les mécanismes de l'aggravation de la maladie au cours du vieillissement ;
 - de développer une thérapie préventive de cette maladie.
- 2) Le développement de stimulateurs cardiaques biologiques, c'est-à-dire remplacer les cellules ne se contractant pas par des cellules dotées d'une contraction automatique pour réinstaurer un battement normal au cœur. L'objectif principal étant de remplacer les stimulateurs cardiaques mécaniques qui peuvent parfois amener à des effets secondaires, tels que des décharges non contrôlées (un emballement du cœur inattendu) et qui doivent être remplacés tous les 10 ans.
- 3) L'étude des mécanismes d'un autre trouble du rythme, impliquant plusieurs protéines fondamentales au fonctionnement du cœur.

Ainsi, mon projet de thèse a consisté à étudier l'implication de la protéine Nav1.5 dans les troubles de la conduction. Projet soutenu par 2 ANRs¹², projet en collaboration avec d'autres laboratoires français de recherche et qui entre dans un projet d'étude européen, regroupant 3 laboratoires européens.

¹² ANR : Agence Nationale de la Recherche, établissement public finançant des projets de recherche après sélection sur dossier.

Mon projet

La préparation de mon diplôme universitaire technologique (DUT) en Analyses Biologiques et Biochimiques, à l'institut universitaire et technologique d'Angers, m'a fait découvrir les nombreux domaines de la biologie (la bactériologie, la biochimie, la physiologie...) et m'a permis de faire mon premier stage dans un laboratoire de recherche. Je suis en effet partie 3 mois au Canada, travailler dans un laboratoire privé spécialisé dans l'étude de l'ADN des plantes.

Cette première approche de la science m'ayant beaucoup plu, j'ai poursuivi mes études en intégrant une licence professionnelle à Paris spécialisée en chimie et en biologie.

Après cette année (riche en chimie), j'ai préféré me spécialiser en biologie en rejoignant en 2005 un master 1 spécialisé en biologie-biochimie à l'université de Nantes. J'ai intégré l'unité de recherche Inserm U915 (U533 à l'époque) à cette période, pour effectuer mon stage que j'ai poursuivi au cours de mon master 2 de recherche.

Puis en 2007, les Docteurs Jean Mérot et Flavien Charpentier m'ont proposé leur sujet de thèse qui m'a beaucoup plu et me semblait être un vrai challenge à relever.

Le sujet n'est pas facile, mais très motivant. Le sujet proposé étant très vaste, j'ai pu définir avec leur aide, les grandes lignes de mon projet. Pour mener à bien celui-ci j'ai eu la chance d'apprendre et de mettre en place plusieurs nouvelles techniques.

DEROULEMENT, GESTION ET COUT ESTIME DU PROJET

Préparation et cadrage du projet

Le laboratoire étudie depuis 2004 un modèle de souris transgéniques pour la protéine Nav1.5. Le laboratoire a mis en évidence que ces souris développent, comme les patients souffrant de la maladie de Lenègre, des troubles de la conduction cardiaque qui apparaissent au cours du vieillissement. Le plus intrigant est que ces souris, vivant toutes dans le même environnement et ayant le même patrimoine génétique, développent des troubles de la conduction plus ou moins marqués.

En fait, 50% de la population développe des troubles importants avec une modification du tissu cardiaque. L'autre moitié a une conduction peu perturbée et la morphologie du cœur reste intacte. Ces souris ont toutes la même modification génétique mais, l'expression de la protéine Nav1.5 est plus perturbée chez les souris développant d'importants troubles de la conduction.

L'objectif de mon travail est de comprendre pourquoi la protéine est moins présente chez certaines souris transgéniques.

Ce projet palpitant est financé par la Fondation de la Recherche Médicale. Nous avons la chance d'avoir un modèle de souris qui développent des troubles du rythme avec des degrés de sévérité différents comme les Hommes. En comprenant le développement des troubles de la conduction chez les souris transgéniques, nous espérons pouvoir mettre en place un traitement préventif au développement de ces troubles chez ces souris puis le mettre en application chez l'Homme.

Après analyse de la bibliographie, nous avons décidé de mettre en place 2 sous-projets (qui ont été menés de front):

- l'étude de la synthèse de Nav1.5.
- l'identification de marqueurs biologiques, appelés miRNAs, entre les souris transgéniques sévèrement malades, celles avec un profil proche des souris sauvages et les souris sauvages.

Déroulement des projets

Projet 1 :

Il s'agit d'une étude de sciences fondamentales, *in vitro*¹³.

Projet 1	Techniques	temps de mise au point	Conclusions	
Objectif n°1: identifier un modèle d'étude	-travail sur des cellules de cœur adulte de souris	4 mois	échec	BIBLIOGRAPHIE
	-travail sur des cellules de cœur de souriceaux	1 mois	réussite	
Objectif n°2: repérer le canal Nav1.5 situé à la membrane	-test de différentes techniques	2 mois	échec	
	- bibliographie sur la recherche d'une nouvelle technique	1 mois		
	-mise en place d'une nouvelle technique de marquage des protéines à la membrane, au laboratoire, la biotinylation, exploitation de la technique	6 mois	réussite	
Objectif n°3:	-bibliographie sur la recherche d'une nouvelle technique			

¹³ *In vitro* correspond aux expériences menées hors d'un organisme vivant.

déterminer le temps de vie de la protéine	-apprentissage du « pulse chase », optimisation de la technique, exploitation de la technique	6 mois	réussite	
---	---	---------------	-----------------	--

Pour mener à bien ce projet, je présente mes résultats au cours de réunions hebdomadaires avec mes encadrants et au cours de réunions semestrielles avec nos collaborateurs d'ANRs. J'ai également participé à un colloque international à Giens où je commentais un poster.

Projet 2 :

Pour ce projet, je travaille sur les souris *Scn5a^{+/-}*. Je cherche à identifier une différence d'expression de marqueurs biologiques entre les souris transgéniques sévèrement malades et celles proches des souris sauvages. J'ai mis en place ce projet en m'appuyant sur la bibliographie et en prenant contact avec d'autres laboratoires connaissant le domaine et les techniques à utiliser.

Une fois ce projet établi je l'ai présenté à mon équipe, soutenue par mes directeurs de thèse et depuis nous faisons une réunion mensuelle pour suivre l'avancement du projet.

Projet 2	Techniques	temps de mise au point	Conclusions	
Objectif n°1: mise en place du projet	-bibliographie			BIBLIOGRAPHIE
	-prise de contacts avec des laboratoires spécialisés	1 mois		
Objectif n°2: recherche d'une différence de marqueurs biologiques entre les souris malades et les souris saines	-apprentissage de nouvelles techniques, aidées par le personnel du laboratoire	5 mois	réussite	
	-screening d'un large nombre de marqueurs	1 mois	=> pas de différences entre les souris malades et les saines, mais contrôles non fiables => échec	
	-screening par une autre technique	12 mois	=> des différences se dégagent mais beaucoup de mises au point encore à faire => réussite	

	-réflexion et bibliographie			
Objectif n°3: déterminer le rôle précis joué par un marqueur biologique	-mise au point de nouvelles techniques	12 mois	réussite	BIBLIOGRAPHIE

J'ai eu la chance de pouvoir présenter des résultats préliminaires de ce travail au cours d'un colloque en Allemagne et en commentant un poster dans un congrès de cardiologie français.

Ces 2 projets sont très intéressants mais demandent beaucoup de mises au point. Ils ont été ralentis dans leur avancement suite à des imprévus tels que le déménagement de notre laboratoire en juin 2009 qui nous a bloqués un bon mois. De plus, l'ouverture de la nouvelle animalerie, qui doit accueillir les animaux transgéniques, a pris du retard, elle était prévue pour décembre 2009, elle a ouvert en juin 2010...

Pour éviter de perdre trop de temps suite au déménagement j'avais organisé mes manipulations de façon à n'avoir que des analyses à faire sur mon ordinateur pendant la période de réaménagement.

En ce qui concerne la fermeture de l'animalerie, nous avons prévu à l'avance l'étude à long terme sur nos animaux, ce qui m'a permis de sacrifier tous mes animaux à un âge avancé juste avant la fermeture et de pouvoir congeler le matériel qu'il me fallait pour mes études. J'ai ainsi pu poursuivre mon travail sur ces souris jusqu'à la fin de ma thèse. Mais une ouverture plus précoce m'aurait peut-être permis d'envisager d'autres manipulations et de faire des vérifications.

Estimation et prise en charge du coût du projet

Le coût total de ma thèse est d'environ 170 000 euros (cf tableau excel joint). L'université, la fondation pour la recherche médicale, l'Inserm et l'association Génavie¹⁴ ont financé la plus grande partie de mon travail.

La majorité de ces fonds ont servi à me financer. N'ayant pas de bourse ministérielle, j'ai cherché avec mes directeurs de thèse un financement chaque année. Mon salaire a été assuré par une fondation, la fondation Génavie⁵ et par la fondation pour la recherche médicale.

Le plus gros investissement de ma thèse s'est retrouvé dans les consommables. Certaines techniques ont un coût élevé, car elles font appel à de la haute technologie qui a nécessité beaucoup de mises au point, elles sont d'une grande sensibilité. Par exemple, j'ai réalisé des puces d'analyses à haut débit dont le prix pour 8 puces est de 6043 euros, puis d'autres puces, sur 56 échantillons, à 1184 euros le lot de 4, donc à 16576 euros pour les 56 échantillons. J'utilise aussi quotidiennement des Anticorps, dont le prix d'achat est rarement inférieur à 300 euros et un flacon fait 2 mois, c'est-à-dire pour étudier un Anticorps sur 3 ans, nous dépensons 5400 euros.

⁵ Génavie est une association, qui a été fondée en 2006 autour de l'institut du thorax afin de trouver des fonds pour financer des étudiants et pour aider le financement de certains projets.

En décembre 2009 nous avons acquis un appareil de détection des protéines par lecture lumineuse. Cet appareil de 30 000 euros, est composé d'une caméra ultra sensible qui peut travailler en lumière blanche et dans les UVs. Cet appareil remplace les films photos, que nous utilisons en routine pour capter la lumière. Grâce à cet appareil très sensible, relié directement à un logiciel de traitements informatiques, nous pouvons analyser plus aisément nos résultats. Cet appareil est utilisé quotidiennement et est commun à 3 équipes.

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples.

Au cours de ma thèse j'ai pu développer et acquérir de nombreuses compétences dans différents domaines :

Compétences scientifiques :

Ayant travaillé sur un projet vaste, j'ai eu la chance d'apprendre de nombreuses techniques dans plusieurs spécialités scientifiques.

Je maîtrise principalement des techniques :

- de biochimie (analyse de protéines par Western Blot, analyse par immunofluorescence....couplées à des manipulations de radioactivité) ;
- de culture cellulaire (entretien de lignées stables, isolement et entretien de cultures primaires...);
- de biologie moléculaire (RT-PCR par la technologie *TaqMan*, extraction ADN et ARN....).

J'ai aussi dû mettre au point et rédiger des protocoles, notamment une technique de marquage des protéines membranaires que nous utilisons maintenant en routine et que je suis allée enseigner à une équipe parisienne.

Compétences de communication :

J'ai également appris à échanger mes connaissances et à présenter mes résultats scientifiques sous différentes formes, présentations orales et posters, au cours de colloques internationaux (Giens, Cologne, Nantes) et de réunions avec nos collaborateurs.

Compétences transversales :

- Rédaction de dossiers administratifs
N'ayant pas un financement fixe pour mes 3 années de thèse, j'ai eu à rédiger des dossiers administratifs. Par exemple pour ma troisième année, nous avons préparé un dossier pour la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Ce dossier consistait, d'une part à préparer un rapport vulgarisé de mon travail pour le grand public et d'autre part, à présenter de manière succincte mon travail pour convaincre la communauté scientifique. Ce dossier n'a pas été accepté mais m'a permis de réfléchir et de prendre du recul sur mon projet, ce qui m'a aidé à préparer un dossier pour la fondation Génavie, qui finance ma dernière année de thèse.

- Travailler en équipe
J'ai appris à encadrer des étudiants, à les former techniquement mais aussi scientifiquement et à déléguer une partie de mon travail aux techniciens (qui sont d'une grande aide par leur soutien).

- Gérer les commandes
Travaillant sur des animaux, j'ai dû apprendre à m'organiser pour que les animaux commandés aient le bon âge, arrivent en temps souhaité pour faire les manipulations et ne pas surcharger l'animalerie.
J'ai aussi dû interagir avec les commerciaux pour débattre des prix avec eux. J'ai également fait des tests techniques pour essayer de trouver les produits les plus avantageux. J'ai notamment testé des produits de détection des protéines de 3 fournisseurs différents.

Je sors de cette expérience dynamique et motivée à partager mes compétences dans un nouveau cadre.

Résultats, impact de la thèse

Au cours de ces 3 années, j'ai participé à la rédaction d'une revue et j'ai obtenu des résultats qui vont pouvoir permettre de rédiger une publication scientifique. Cette publication portera sur la description de la synthèse du canal.

Les résultats sur les marqueurs biologiques, les miRNAs, demandent des analyses complémentaires. Maintenant que j'ai identifié un marqueur nous devons comprendre son rôle, son implication dans les troubles de la conduction et voir comment nous pouvons contrer ses effets. Le travail restant à faire est long, il va pouvoir être repris par un autre étudiant qui commence une thèse.

J'ai aussi mis en place de nouvelles techniques utilisées aujourd'hui en routine pour étudier Nav1.5 mais aussi d'autres protéines.

Identifications de pistes professionnelles

Suite à ces trois années de thèse, j'ai appris à être autonome, à rédiger, présenter des rapports et à mettre au point des protocoles. Je souhaite par la suite développer ces compétences et j'espère en découvrir de nouvelles, plus administratives.

Je souhaiterais rejoindre le privé et le secteur des biotechnologies constitue le cœur de ma cible.

Au cours de ces trois années, je me suis découverte très persévérante et j'ai apprécié la recherche de mise en place de nouveaux protocoles. Dans un premier temps, je serais intéressée d'être recrutée comme ingénieur en recherche et développement dans une société de services telle que Miltenyi Biotec ou Millipore, qui sont des entreprises avec un grand axe de recherche en Europe. Connaissant bien leurs produits et ceux de leurs concurrents et ayant des domaines de compétences scientifiques très vastes je pense avoir un profil intéressant pour les aider à développer et à optimiser leurs produits.

Je souhaite partir à l'étranger pour découvrir une nouvelle culture mais aussi et surtout pour perfectionner mon anglais. Le pôle de recherche de Miltenyi Biotec est basé en Allemagne, cela me permettrait d'enrichir mon anglais, mais aussi d'améliorer mon allemand.

Par la suite (ou si l'opportunité se présente dès la fin de ma thèse) j'aimerais travailler au sein d'une petite PME ou start up en tant que chef de projet junior. Le travail me paraît beaucoup plus enrichissant que dans une grande firme. Je peux leur apporter mes connaissances et mon savoir-faire en sciences et je pourrai apprendre à développer des tâches plus administratives. La start-up M-fold Biotec en Allemagne, semble correspondre à mes attentes, ils sont spécialisés dans l'étude des protéines membranaires, protéines que j'ai étudiées au cours de ma thèse.

Un modèle de la maladie de Lenègre, les souris *Scn5a*^{+/-} : étude du canal ionique Nav1.5 et des miRNAs régulateurs.

De nombreuses mutations du gène *Scn5A*, codant le canal cardiaque sodique Nav1.5, ont été trouvées chez des patients souffrant de différentes pathologies cardiaques responsables de morts subites telles que la maladie de Lenègre ou le syndrome de Brugada. Nav1.5 joue un rôle majeur dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action cardiaque. Afin de mieux comprendre l'implication de Nav1.5 dans ces pathologies, j'ai travaillé sur un modèle de souris invalidée de façon hétérozygote pour le gène *Scn5a*, *Scn5a*^{+/-}.

Ces souris ont la particularité de développer au sein d'une même portée des troubles de la conduction plus ou moins prononcés. Les souris *Scn5a*^{+/-} ayant des troubles de la conduction sévères développent, comme dans la maladie de Lenègre, de la fibrose en vieillissant. Pour expliquer cette différence de phénotype, j'ai étudié la biosynthèse du canal Nav1.5. Par des expériences de marquage métabolique j'ai estimé à 3h50 la demi-vie du canal Nav1.5 néo-synthétisé et j'ai montré que la présence de la sous-unité β_1 régulatrice du canal ne modifiait pas cette cinétique. Par des approches biochimiques, j'ai aussi montré que le canal Nav1.5 dans les membranes plasmiques est très stable et est peu endocyté. J'ai également étudié le profil d'expression des miRNAs cardiaques des souris *Scn5a*^{+/-}. Parmi les 117 miRNAs mis en évidence, j'ai détecté la surexpression de miR-574-3p dans les cœurs de souris adultes *Scn5a*^{+/-} développant des troubles sévères de la conduction et la sous expression de miR-23a dans les cœurs de jeunes souris *Scn5a*^{+/-}.

L'ensemble de ces résultats ouvre des nouvelles perspectives pour appréhender les mécanismes impliqués dans la maladie de Lenègre.

Mots clés : Nav1.5, miRNAs, troubles de la conduction, expression membranaire, canal ionique.

A model of Lenègre disease, *Scn5a*^{+/-} mice: ion channel Nav1.5 study and miRNAs regulators.

Many mutations in *Scn5A* gene encoding Nav1.5 cardiac sodium channel, were identified in patients suffering from cardiac channelopathies such as Lenegre disease or the Brugada syndrome, responsible for sudden death. Nav1.5 plays a key role in the generation of the cardiac action potential and in its propagation. To understand the role of Nav1.5 in these syndromes, we are using a mouse model invalidated for *Scn5a* at the heterozygous state (*Scn5a*^{+/-}).

Interestingly, littermates *Scn5a*^{+/-} mice develop either severe or mild conduction defects. In addition, mice with severe conduction defects develop fibrosis with aging, as do patients with Lenègre disease. To explain these different phenotypes I analyzed Nav1.5 biosynthesis. Using metabolic labeling in pulse chase experiments I determined a half-life of 3h50 for neo-synthesized Nav1.5 and showed that the presence of β_1 auxiliary subunit did not influence Nav1.5 synthesis and stability. On the other hand, using biochemical analysis and membrane biotinylation experiments I showed that, once expressed in the plasma membranes, Nav1.5 was very stable and exhibited little endocytosis. I also analyzed the cardiac miRNA expression profiles of *Scn5a*^{+/-} mice. Among the 117 miRNAs identified, I showed that miR-574-3p was over-expressed in adult *Scn5a*^{+/-} mice with severe conduction defects whereas miR-23a was under-expressed in young *Scn5a*^{+/-} mice.

Altogether, these data open new avenues of research to understand the mechanisms of Lenègre disease.

Keywords: Nav1.5, ion channels, conduction defects, membrane expression, miRNAs.