



Étude électrophysiologique de canalopathies d'origine génétique causant des troubles du rythme cardiaque

Yohann Vincent

► To cite this version:

Yohann Vincent. Étude électrophysiologique de canalopathies d'origine génétique causant des troubles du rythme cardiaque. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10152 . tel-01258730

HAL Id: tel-01258730

<https://theses.hal.science/tel-01258730>

Submitted on 19 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 152-2015

Année 2015

THÈSE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

soutenue publiquement le 16 octobre 2015

par

VINCENT Yohann

**Etude électrophysiologique de canalopathies
d'origine génétique causant des troubles du
rythme cardiaque**

Directeur de thèse : M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Encadrant de thèse : M. le Docteur Georges CHRISTÉ

JURY :

M. le Docteur Sylvain RICHARD

Mme le Docteur Pascale GUICHENEY

M. le Professeur Patrick BOIS

M. le Professeur Jean-François FAIVRE

M. le Professeur Mohamed CHAHINE

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. le Docteur Georges CHRISTÉ

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Avant propos :

Je tiens à remercier tout d'abord, tous les membres du jury, le Pr Sylvain Richard, le Pr Pascale Guicheney, le Pr Patrick Bois, le Pr Mohamed Chahine et le Pr Jean-François Faivre qui ont accepté de juger et d'évaluer mon travail. Leurs expertises ainsi que leurs différentes critiques ont contribué à améliorer grandement le contenu et la forme de ce manuscrit.

Un remerciement spécial au Pr Mohamed Chahine que j'ai eu l'occasion de rencontrer à plusieurs reprises et qui m'a permis, lors d'un voyage à Québec, d'élargir mes connaissances et mes compétences. Mes amitiés à tous les membres de son laboratoire et à toutes les personnes que j'ai rencontrées là bas.

Je remercie le Pr Philippe Chevalier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et accepter de diriger et de suivre l'avancée de ma thèse. Je le remercie aussi pour toutes les opportunités qu'il m'a données, notamment mon séjour au Québec ainsi que de pouvoir présenter mon travail lors d'un congrès à Londres.

Je remercie aussi tous les membres de l'unité EA4612, ainsi que toutes les personnes que j'ai pu côtoyer, pour leur sympathie, et qui ont participé, de près ou de loin, à mon travail. Je souhaite une bonne continuation à l'ensemble de ces personnes et notamment aux autres doctorants de l'Unité, et à tous les stagiaires avec qui j'ai pu partager d'agréables moments. Je remercie le Dr Claude Julien pour tous les conseils qu'il a pu me donner tout au long de ces années et pour toutes ces discussions diverses et variées lors de la pause déjeuner.

Enfin, je remercie surtout le Dr Georges Christé qui a encadré mes recherches, pour sa rigueur et pour toute l'aide qu'il a pu me donner. Je le remercie très sincèrement de sa sympathie, de son amitié et pour toutes les connaissances et les compétences qu'il m'a transmis. Je n'oublierai pas nos heures de bricolage en tous genres, entre les soudures, les roulements à bille du microscope, les réparations et les différents montages qu'il a réalisés afin d'améliorer le confort de nos manip.

Enfin, je remercie, tous mes amis et toute ma famille pour leurs encouragements et leur soutien.

A mes frères,

A ma petite sœur,

A la mémoire de mes parents.

Etude électrophysiologique de canalopathies d'origine génétique causant des troubles du rythme cardiaque

Résumé :

L'unité de recherche EA4612 de l'Université Claude Bernard Lyon 1 s'intéresse à la physiopathologie des troubles du rythme cardiaque, en particulier au caractère héréditaire des syndromes du QT long et de la fibrillation atriale. Nous avons étudié deux mutations du gène hERG (Human ether-a-go-go related gene) et une mutation du gène SCN5A (sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit) découvertes chez des patients hétérozygotes atteints d'un syndrome du QT long ainsi que deux mutations du gène HCN4 (hyperpolarization and cyclic nucleotide-gated channel type 4) découvertes par notre partenaire Chinois Yi-Qing Yang (Shanghai) chez des porteurs hétérozygotes atteints de bradycardie sinusale et de fibrillation atriale.

Nous avons caractérisé les propriétés biophysiques des courants ioniques résultant de l'expression hétérologue du gène d'intérêt (muté ou non) dans des cellules d'ovocyte de Xénope ou dans une lignée de cellules de mammifère (Cos-7). Nous avons également testé la plausibilité des conséquences fonctionnelles de ces altérations dans des modèles mathématiques pertinents de cellules cardiaques ventriculaires ou sino-atriales.

En comparaison avec les propriétés de la protéine sauvage (notée WT), l'effet de la mutation est analysé pour la protéine mutée exprimée seule mais aussi en coexpression avec la protéine WT, ce qui s'apparente à la condition hétérozygote des patients porteurs.

La mutation R148W du gène hERG exprimée dans des ovocytes de Xénope ne change pas les propriétés d'activation, de désactivation et d'inactivation du courant mais diminue le courant maximal de 29%. Dans un modèle de myocyte cardiaque ventriculaire humain, ceci allonge la durée du potentiel d'action, ce qui pourrait rendre compte du phénotype QT long des porteurs.

La mutation F627L du gène hERG se situe au centre du motif de sélectivité ionique (GFG) de la protéine hERG et cause une perte de la sélectivité ionique du courant, une perte de la propriété d'inactivation et une diminution importante de

sensibilité aux bloqueurs spécifiques Dofétilide et E4031. Ainsi, la présence du groupement aromatique de la chaîne latérale semble essentielle au maintien des propriétés du canal.

La mutation Q1476R du gène SCN5A provoque un gain de fonction d'une composante lente du courant sodique portée par le canal Na_v1.5. Dans un modèle de cellule cardiaque ventriculaire humaine, nous montrons que la surcharge intracellulaire en ions Na⁺ qui en résulte aurait un effet protecteur vis-à-vis de l'allongement de la durée du potentiel d'action ventriculaire, en opposition à l'effet électrique direct du gain en courant qui allonge le PA.

La mutation D600E du gène HCN4 cause une accélération de la désactivation, ce qui diminuerait la disponibilité du courant I_f et pourrait causer une bradycardie. Par ailleurs, la mutation abolit la réponse à la suppression de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire.

La mutation V501M du gène HCN4 cause une perte totale de courant à l'état homozygote. A l'état hétérozygote, l'amplitude moyenne du courant mesuré est certes identique à celle mesurée chez le WT mais on observe seulement 45% des cellules transfectées qui expriment un courant HCN4 contre 71% pour le WT. De plus, la mutation est responsable d'un décalage négatif de 9 mV de la courbe d'activation. Ces effets rendraient compte du phénotype bradycarde des patients porteurs et de leur prédisposition à la fibrillation atriale.

Mots clés :

Electrophysiologie

Canalopathie

hERG

SCN5A

HCN4

Génétique

Mutation

Pharmacologie

Electrophysiological study of genetic channelopathies causing disorders of heart rhythm

Abstract:

The EA4612 unit of the Université Claude Bernard Lyon 1 is interested by the pathophysiology of heart rhythm disorders. The hereditary nature of atrial fibrillation and long QT syndromes are among its concerns. We studied two mutations in the hERG gene (Human ether-a-go-go related gene) discovered in Lyon in heterozygous patients with long QT and two mutations in the HCN4 gene (hyperpolarization and cyclic nucleotide-gated channel type 4) discovered by our Chinese partner Yi-Qing Yang (Shanghai) in heterozygous carriers with sinus bradycardia and atrial fibrillation.

We characterized the effects of these mutations on the biophysical properties of ionic currents resulting from the heterologous expression in *Xenopus* oocyte cells or in a mammalian cell line (Cos-7). We also tested the plausibility of functional consequences of these alterations in relevant mathematical models of sino-atrial or ventricular heart cells. Compared with the properties of the wild-type protein (WT), the effect of the mutation is analyzed for the mutated protein expressed alone and also in coexpression with the WT protein, which is comparable to the heterozygous condition observed in patients.

The R148W mutation of the hERG gene does not alter the properties of activation, deactivation and inactivation of the current expressed in *Xenopus* oocytes but decreases the maximum current by 29%. In a human model of ventricular cardiac myocyte, this causes a lengthening of the duration of the action potential, which may account for the long QT phenotype.

The F627L mutation of the hERG gene is located in the center of the selectivity filter (GFG) of the hERG protein and causes a loss of the ion selectivity of the current, the loss of the property of inactivation and a significant decrease of sensitivity to the specific blockers Dofetilide and E4031. Thus, the presence of this aromatic amino acid appears essential to the maintenance of the properties of the channel.

Mutation Q1476R in the SCN5A gene causes a gain-of-function of a slow component of the sodium current carried by the Na_v1.5 channel. In a model of a human ventricular cardiac myocyte, we show that this causes an intracellular Na⁺ overload that likely dampens the lengthening of the action potential duration caused by the direct electrical effect of the increased current.

The D600E mutation of the HCN4 gene expressed alone or with the WT causes an acceleration of the deactivation, which would decrease the availability of the I_f current and cause bradycardia. Moreover, the mutation abolishes the response to the depletion of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP).

The V501M mutation of the HCN4 gene causes a total loss of current at homozygous state. At heterozygous state, the amplitude of the current is identical to that measured in WT, but only 45% of the transfected cells expressed the HCN4 current, versus 71% for the WT. Thus, this phenomenon causes a significant loss of current. Furthermore, this mutation is responsible for a negative shift by 9 mV of the activation curve. These effects would explain the bradycardic phenotype of carrier patients and their susceptibility to atrial fibrillation.

Key words:

Electrophysiology

Channelopathy

hERG

SCN5A

HCN4

Genetics

Mutation

Pharmacology

Intitulé et adresse du laboratoire :

EA 4612 Neurocardiologie.

Physiopathologie des troubles du rythme cardiaque.

Université Lyon 1.

Faculté de Pharmacie de Lyon.

8 avenue Rockefeller

69373 Lyon cedex 08

Table des matières :

1	Introduction générale	1
2	Recherches bibliographiques	5
2.1	Bases ioniques du potentiel d'action	5
2.1.1	Couplage excitation-contraction.....	5
2.1.2	SCN5A et courant I _{Na}	6
2.1.3	KCNH2 et courant I _{Kr}	10
2.1.4	HCN4 et courant I _f	21
2.2	Troubles du rythme cardiaque et canalopathies	34
2.2.1	Le syndrome du QT long	34
2.2.2	Le syndrome du QT court	37
2.2.3	La fibrillation atriale	38
3	Matériels et méthodes	43
3.1	Modèles d'expression utilisés	43
3.1.1	Ovocytes de Xénope	43
3.1.2	Cellules de mammifères	44
3.2	Techniques électrophysiologiques.....	47
4	Résultats	51
4.1	La mutation Q1476R du gène SCN5A entraîne une surcharge sodique due à une augmentation du courant persistant	51
4.1.1	Introduction	51
4.1.2	Résultats et discussion	51
4.1.3	Conclusion	53
4.1.4	Publication	53
4.2	La mutation R148W du gène KCNH2, exprimée à l'état hétérozygote, diminue la densité du courant hERG et prédispose à des arythmies	67
4.2.1	Introduction	67

4.2.2	Résultats et discussion	67
4.2.3	Publication	69
4.3	Le résidu aromatique F627 de la protéine hERG joue un rôle crucial dans les phénomènes d'inactivation, de sélectivité ionique et de sensibilité pharmacologique du canal	79
4.3.1	Introduction	79
4.3.2	Méthodes	79
4.3.3	Résultats.....	83
4.3.4	Discussion	94
4.3.5	Conclusion	96
4.4	La mutation hHCN4/D600E annule la réponse des canaux à la suppression d'AMP cyclique et accélère leur désactivation	98
4.4.1	Introduction	98
4.4.2	Résultats et discussion	98
4.4.3	Publication	100
4.5	La mutation V501M de la protéine HCN4 diminue l'expression et altère l'activation des canaux	154
4.5.1	Introduction	154
4.5.2	Matériels et méthodes	155
4.5.3	Résultats.....	155
5	Discussion générale et perspectives	163
6	Conclusions.....	167
7	Références bibliographiques	169

Liste des abréviations :

aa. : acide aminé (acides aminés)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMPC : Adénosine mono-phosphate cyclique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

cNBD : cyclic nucleotide binding domain

CNG : cyclic nucleotide-gated channels

Cos-7 : lignée cellulaire de singe portant le matériel génétique du virus SV40

ECG : électrocardiogramme de surface

FA : fibrillation atriale

HCN1-4 : hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels type 1-4

HEBS : HEPES buffered saline

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hERG : human ether-a-go-go related gene

IC₅₀ : concentration causant une inhibition de 50%

I_f : funny current, courant activé par l'hyperpolarisation

I_{Kr} : courant potassique rectifieur entrant rapide

I_{Na} : courant sodique

Kb : Kilobase

KDa : KiloDalton

mM : millimolaire, millimole par litre

ms : milliseconde

mV : millivolt

nA : nanoAmpère

NMDG : N-méthyl-D-glucosamine

NSA : nœud sino-atrial, nœud sinusal

PA : potentiel d'action

pA : picoAmpère

PBS : phosphate buffered saline

pF : picoFarad

pm : picomètre

QT, intervalle QT : durée s'écoulant entre l'onde Q et la fin de l'onde T de l'électrocardiogramme

QTc : intervalle QT corrigé

SCN5A : sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit ; Na_v1.5

SQTC : syndrome du QT court

SQTL : syndrome du QT long

V_{ha} : voltage de demi-activation

VSD : voltage sensor domain

WT : wild type

Liste des figures :

Figure 1 : Bases ioniques et moléculaires du potentiel d'action ventriculaire cardiaque.....	1
Figure 2 : Cœur et système de conduction.....	3
Figure 3 : La cellule cardiaque.....	6
Figure 4 : Structure du canal Nav1.5.	8
Figure 5 : Structure du canal potassique hERG.....	11
Figure 6 : Synthèse, maturation et dégradation de la protéine hERG.....	12
Figure 7 : Structure génomique des différents variants de sous-unité α de hERG. .	13
Figure 8 : Changements d'état du canal hERG.	14
Figure 9 : Courant hERG enregistré dans des cellules CHO en réponse à un potentiel d'action.....	16
Figure 10 : Allure caractéristique du courant hERG.....	17
Figure 11 : Modèle multi-états du canal hERG.	17
Figure 12 : Structure de la protéine HCN4.....	23
Figure 13 : Séquences nucléotidiques des sous-unités HCN1 à HCN4 humaines. .	24
Figure 14 : Ivabradine et canaux HCN.....	28
Figure 15 : Site de fixation de l'Ivabradine.	28
Figure 16 : Mutations du gène HCN4.	29
Figure 17 : ECG caractéristique d'un QT long.	34
Figure 18 : Syndrome du QT long et post-dépolarisations.	35
Figure 19 : Caractère multifactoriel de la FA.....	40
Figure 20 : Modèle conceptuel de la mise en place et du maintien de la fibrillation atriale.....	41
Figure 21 : Mesure en voltage-clamp à double microélectrodes.....	48
Figure 22 : Patch-clamp en configuration cellule entière.	49
Figure 23 : Modélisation de l'effet de la mutation Q1476R du gène SCN5A sur le potentiel d'action.....	52
Figure 24 : Analyse du potentiel d'inversion du courant hERG.....	82
Figure 25 : Tracés représentatifs du courant hERG.	84
Figure 26 : Effets de la mutation F627L sur l'amplitude du courant hERG.	85
Figure 27 : Cinétiques d'activation du courant hERG.	86

Figure 28 : Processus de désactivation du courant hERG.	87
Figure 29 : Effet de la mutation F627L sur la désactivation du courant hERG.....	88
Figure 30 : Processus d'inactivation du courant hERG.....	89
Figure 31 : Inactivation à l'état stable du courant hERG.....	90
Figure 32 : Effet de la mutation F627L sur le potentiel d'inversion du courant hERG.	91
Figure 33 : Analyse de la spécificité ionique du canal hERG.....	93
Figure 34 : Effets de la mutation F627L sur la sensibilité de hERG à E4031 et au dofétilide.	94
Figure 35 : Effet de la mutation V501M sur les courbes courant/voltage du courant HCN4.....	156
Figure 36 : Caractéristiques biophysiques du mutant V501M exprimé dans les cellules Cos- 7.	157
Figure 37 : Réponse à l'ivabradine du courant HCN4 exprimé dans des cellules Cos- 7.	158
Figure 38 : Effets de la mutation V501M dans un modèle de cellule du NSA.	159
Figure 39 : Western blot des protéines totales.....	160
Figure 40 : Observations des cellules Cos-7 exprimant les canaux HCN4 WT et mutés au microscope confocal.	161
Figure 41 : Assemblage des sous-unités en présence d'une mutation hétérozygote.	166

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Mutations du gène HCN4 publiées dans la littérature.	30
Tableau 2 : Les différentes formes de syndrome du QT long congénital et leurs gènes associés.....	36
Tableau 3 : SQTC congénital et gènes associés	38
Tableau 4 : Génétique et FA.....	40
Tableau 5 : Composition des solutions utilisées lors de différentes expérimentations.	80
Tableau 6 : Valeurs des paramètres des fonctions de Boltzmann ajustées aux données de l'activation et de l'inactivation.....	90
Tableau 7 : Valeurs de l'ajustement par l'équation de Hill des données de la courbe dose-réponse à l'ivabradine.....	159

1 Introduction générale

Le fonctionnement de la pompe cardiaque est assuré par une activation synchronisée des cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes. Ceux-ci vont se contracter en réponse à un stimulus qui se propage de cellules à cellules, le potentiel d'action (PA), qui résulte de l'activation successive de différents courants ioniques (**Figure 1**). La forme et la durée des PA sont différentes selon la région du cœur, du fait d'une organisation spatio-temporelle différente de ces courants. On différencie alors les PA de type sinusal au niveau des cardiomyocytes du nœud sinusal ou du nœud atrio-ventriculaire, des PA de type atrial dans les oreillettes et de type ventriculaire dans les cardiomyocytes ventriculaires.

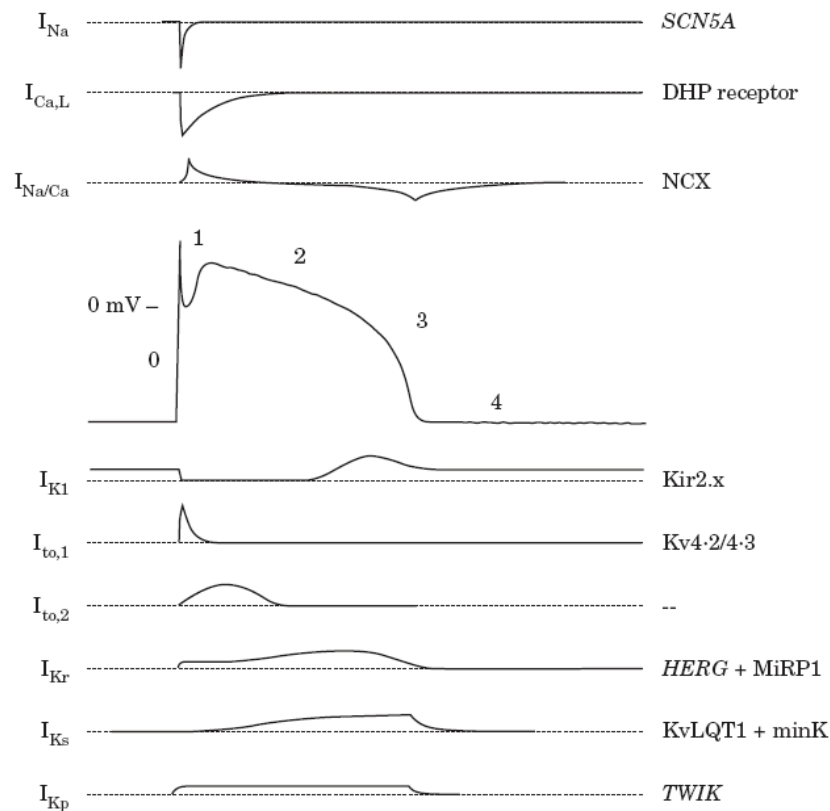


Figure 1 : Bases ioniques et moléculaires du potentiel d'action ventriculaire cardiaque.

Sa forme caractéristique résulte de multiples activations, imbriquées dans le temps, de courants entrants dépolarisants et de courants sortants repolarisants. Les numéros correspondent aux différentes phases du potentiel d'action :

0 : dépolarisation rapide, 1 : repolarisation transitoire ("notch"), 2 : plateau, 3 : repolarisation, 4 : diastole (extrait de Haverkamp et al., 2000).

Le potentiel d'action des cellules cardiaques ventriculaires peut être décomposé en 5 phases :

Phase 0 : correspond à une phase de dépolarisation de la membrane des cellules, induite par l'activation principalement de canaux sodiques qui génèrent un courant entrant d'ions Na^+ de grande amplitude (I_{Na}). Durant cette phase, le potentiel membranaire passe de -80 mV à une valeur qui se rapproche de celle du potentiel d'équilibre du sodium ($E_{\text{Na}^+} = +30 \text{ mV}$). Des canaux calciques y participent également en générant un courant entrant d'ions calcium.

Phase 1 : correspond à une phase courte de repolarisation précoce qui résulte de la combinaison de l'inactivation des canaux Na^+ et de l'activation d'un canal potassique qui va générer un courant repolarisant transitoire sortant (I_{Kt0}), surtout présent dans les cellules atriales.

Phase 2 : correspond à la phase du plateau du potentiel d'action où différents courants ioniques repolarisants sont activés progressivement (courants I_{Kr} et I_{Ks}).

Phase 3 : correspond à la phase de repolarisation membranaire due principalement à l'activation des canaux potassiques responsables du courant I_{K1} et du maintien des conductances I_{Kr} et I_{Ks} .

Phase 4 : durant cette phase le potentiel membranaire est maintenu à une valeur négative constante (-80 mV) grâce au courant potassique I_{K1} .

Chez les mammifères, la fonction pacemaker du cœur, d'où est généré spontanément le potentiel d'action qui se propage de proche en proche, est localisée au niveau d'une structure très spécialisée située au sein de la paroi de l'oreillette droite, dans le sinus veineux, le nœud sino-atrial (NSA, ou nœud sinusal) (**Figure 2**). Le potentiel d'action sinusal est particulier. Durant la diastole (*phase 4* du PA), qui correspond à la relaxation du myocarde, le potentiel membranaire n'est pas maintenu à une valeur constante mais montre une lente dépolarisation diastolique caractéristique due à l'activation de différents courants ioniques : les courants de fond I_{bg} , le courant pacemaker I_f et le courant calcique $I_{\text{Ca,T}}$.

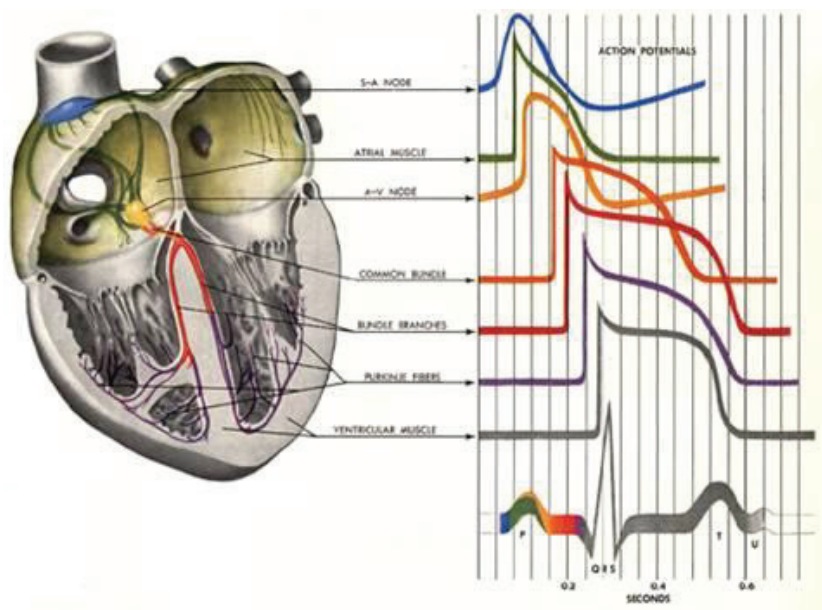


Figure 2: Cœur et système de conduction.

L'influx électrique du cœur (potentiel d'action) est généré au niveau du nœud sinusal (SA node) et se propage de cellule à cellule à travers les oreillettes et provoque leur contraction. L'excitation atteint le nœud atrio-ventriculaire (AV node), passe à travers les faisceaux de conduction interventriculaires puis les fibres de Purkinje en direction de la paroi ventriculaire ce qui aboutit à la contraction des ventricules. Figure disponible à l'adresse <http://www.besancon-cardio.org/multimedia/ch01/ch01-conduction2.htm>.

Le sujet de ce travail porte sur l'étude électrophysiologique de canalopathies d'origine génétique causant des troubles du rythme cardiaque. L'allure et la durée du potentiel d'action étant régulées par la densité des différents courants ioniques, mais aussi par leurs cinétiques d'ouverture et de fermeture, toute modification de ces courants peut potentiellement perturber l'excitabilité des cellules cardiaques.

De nombreuses mutations qui surviennent dans les gènes codant pour des canaux ioniques, ainsi que certains composés chimiques, peuvent altérer les cinétiques et/ou les amplitudes des courants ioniques mis en jeu dans l'excitabilité des cellules cardiaques.

Une modification de ces paramètres peut être à l'origine d'arythmies cardiaques graves. Par exemple, un gain de fonction du courant sodique persistant ou une forte diminution d'un courant potassique peuvent entraîner un syndrome du QT long (LQTS), qui peut prédisposer à la mort subite.

Ainsi, les études rapportées ici établissent un lien entre les mécanismes moléculaires arrhythmogènes des mutations et la pathologie identifiée chez les porteurs, ce qui contribue à la prévention et au traitement personnalisé de ces derniers.

2 Recherches bibliographiques

2.1 Bases ioniques du potentiel d'action

2.1.1 Couplage excitation-contraction

Severi et al. (Severi et al., 2012) proposent un modèle cellulaire d'une cellule cardiaque de mammifère où figurent les différents compartiments cellulaires (incluant le cytosol, l'espace sous-membranaire et le réticulum sarcoplasmique) ainsi que les différents courants ioniques membranaires (**Figure 3**).

La contraction de la cellule cardiaque est initiée par une entrée de calcium à travers les canaux I_{Ca} dépendant du voltage, qui s'ouvrent lors de la dépolarisation faisant suite à l'arrivée du PA. L'augmentation de la concentration en calcium dans l'espace sous-membranaire est alors détectée au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) situé à proximité. Ceci déclenche alors l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RYR2) présents à la surface du RS, qui vont alors décharger les réserves de calcium du RS vers le cytosol. La très grande quantité de calcium relarguée dans le cytosol déclenche le mouvement des myofibrilles ce qui entraîne la contraction de la cellule. Après la contraction, le calcium est ensuite recapté par le RS via la pompe calcique SERCA afin d'être à nouveau disponible pour le cycle suivant (Fabiato, 1983).

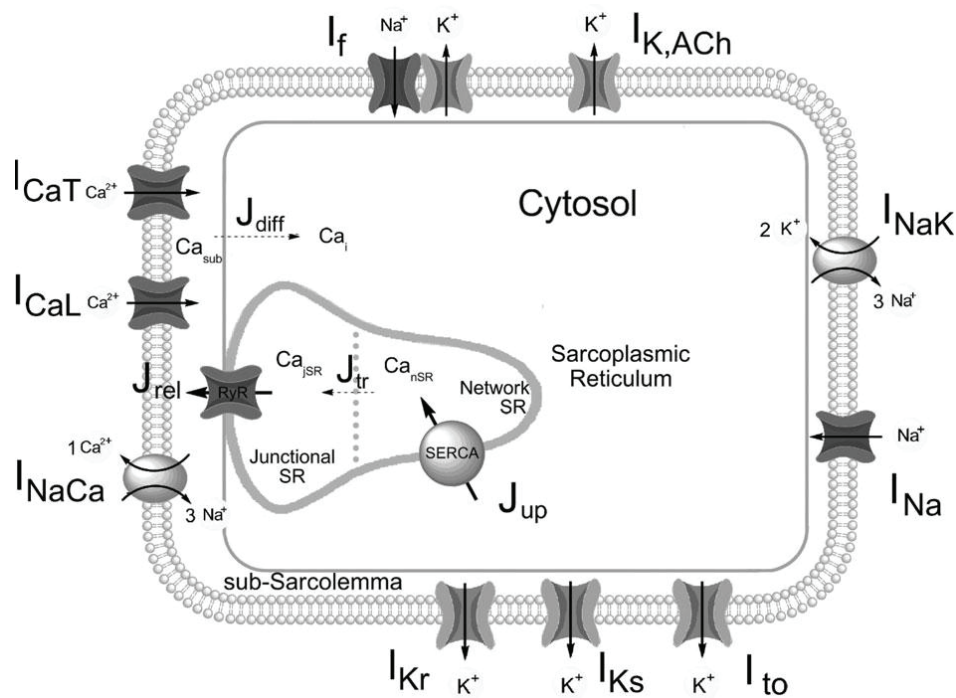


Figure 3 : La cellule cardiaque.

Représentation schématique des différents canaux et transporteurs ioniques présents dans une cellule cardiaque. Extrait de Severi et al., 2012.

2.1.2 SCN5A et courant I_{Na}

2.1.2.1 Généralités

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables du courant sodique entrant (I_{Na}) des cellules excitables. Il a été enregistré et décrit pour la première fois par Hodgkin et Huxley en 1952 (Hodgkin and Huxley, 1952). Dans le cœur, la protéine majeure du courant sodique est la sous unité α $Na_v1.5$, codée par le gène SCN5A. Ce gène a été cloné en 1992 (Gellens et al., 1992) et c'est trois ans plus tard, que sa localisation sur le chromosome 3 (bande 3p21) a été identifiée (George et al., 1995).

SCN5A fait partie de la famille des 10 gènes codant pour une sous unité α particulière d'un canal sodique.

Dans la nomenclature actuelle, les différentes sous unités α des canaux sodiques sont répertoriées de $\text{Na}_v1.1$ à $\text{Na}_v2.1$ et sont codées par différents gènes nommés SCN1A à SCN11A. Ces différentes sous-unités sont distribuées inégalement dans les tissus de l'organisme et confèrent aux différents canaux sodiques des caractéristiques qui leurs sont propres.

On retrouve principalement les sous-unités $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.6$ et $\text{Na}_v2.1$ au niveau du système nerveux central, les sous-unités $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ au niveau du système nerveux périphérique, $\text{Na}_v1.4$ au niveau du muscle squelettique et $\text{Na}_v1.5$ au niveau du tissu cardiaque (revue de Catterall, 2014). Cependant, de nombreuses études montrent que certains de ces canaux sont exprimés de manière significative en dehors de leur tissu spécifique. Ainsi on retrouve des canaux dits « neuronaux », $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6 (Maier et al., 2002; Westenbroek et al., 2013) et 1.8 (Yang et al., 2012), dans le tissu cardiaque ventriculaire. Récemment, des études ont mis en évidence le caractère pathogène de mutations du gène SCN10A, codant pour la sous-unité $\text{Na}_v1.8$, dans la survenue du syndrome de Brugada (Hu et al., 2014; Behr et al., 2015).

Par ailleurs, il a été montré chez la souris que cette distribution des sous-unités Na_v diffère non seulement selon le tissu mais aussi au cours du développement (Haufe et al., 2005). Concernant SCN5A, on dénombre à ce jour une dizaine d'isoformes créés par épissage alternatif (Schroeter et al., 2010). L'isoforme SCN5A-003 est la plus abondante au niveau du cœur humain adulte (Onkal et al., 2008). Elle y remplace l'isoforme SCN5A-001, qualifiée de néonatale, quelques jours après la naissance. On trouve aussi l'isoforme SCN5A-001 au niveau du système nerveux chez l'adulte.

2.1.2.2 Structure protéique

Les canaux sodiques sont composés d'une unique sous-unité α , qui forme la partie principale du canal, associée à une ou plusieurs sous-unités β régulatrices. L'expression de la sous-unité α dans une cellule suffit à fabriquer des canaux sodiques fonctionnels (Goldin et al., 1986). Les sous-unités β , sont seulement des sous-unités régulatrices (Isom et al., 1992, 1995).

La sous-unité α des canaux sodiques est constituée d'une longue protéine transmembranaire formée de 4 domaines homologues (DI à DIV) reliés par des boucles intracellulaires. Chaque domaine contient 6 segments transmembranaires nommés S1 à S6 (**Figure 4**).

Les segments S4 contiennent les domaines qui sont sensibles à la variation du potentiel membranaire (VSD ou voltage sensor domain). Ces segments, riches en résidus chargés positivement (lysine, arginine), caractérisent les canaux ioniques dépendant du voltage. Les modifications du potentiel membranaire sont perçues par ces segments qui vont alors se déplacer légèrement au sein de la membrane. Il s'en suit un changement de conformation du canal ionique qui entre alors dans une conformation ouverte. Le déplacement des charges des segments S4 crée un courant de faible amplitude appelé "courant de porte" (gating current).

Le pore du canal est constitué des segments transmembranaires S5, S6 et des boucles extracellulaires S5-S6 (boucles P) des 4 domaines. La boucle intracellulaire entre les domaines DIII et DIV est impliquée dans le processus d'inactivation du canal.

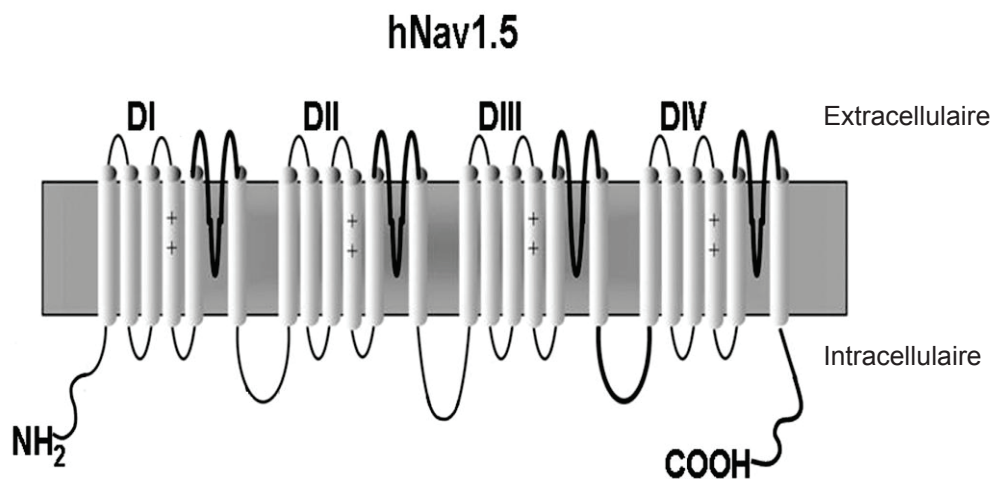


Figure 4 : Structure du canal $\text{Na}_v1.5$.

Représentation schématique de la structure de la sous-unité α du canal $\text{Na}_v1.5$ insérée dans la membrane cellulaire. En trait gras les boucles extracellulaires S5-S6 (boucles P) et la boucle intracellulaire entre les domaines DIII et DIV (extrait de Shinlapawittayatorn et al., 2011).

2.1.2.3 Caractéristiques biophysiques

Le courant I_{Na} s'active à partir d'un certain seuil de dépolarisation de la membrane (~ -60 mV), ce qui crée un influx entrant de sodium dans la cellule. La dépolarisation induite par cette entrée d'ions va augmenter la probabilité d'ouverture des canaux sodiques, ce qui accroît le niveau de dépolarisation et auto-entretien le phénomène de dépolarisation rapide.

L'entrée massive de charges positives dépolarise très rapidement la cellule, puis les canaux adoptent rapidement un état non conducteur via le phénomène d'inactivation (quelques millisecondes après l'ouverture). Ceci se fait de manière dépendante du voltage ce qui favorise l'initiation de la phase précoce de repolarisation (Gellens et al., 1992). Dans les conditions physiologiques, après l'inactivation, les canaux retournent à une conformation fermée afin de redevenir disponibles pour une nouvelle activation.

Durant le potentiel d'action cardiaque humain, une petite fraction du courant sodique persiste et n'est pas complètement inactivée : c'est le courant sodique persistant ou retardé ($I_{Na,L}$: Maltsev et al., 1998). Les canaux $Na_v1.8$ contribueraient à une partie de ce courant persistant dans les myocytes ventriculaires de souris (Yang et al., 2012).

2.1.2.4 Pathophysiologies

Des mutations du gène SCN5A peuvent entraîner des troubles du rythme cardiaque. Les mutations entraînant un gain de fonction (augmentation de l'amplitude du courant persistant) sont associées au syndrome du QT long congénital de type 3 (Wang et al., 1995; Ruan et al., 2009) alors que les mutations entraînant une perte de fonction (diminution de l'amplitude de courant rapide) sont le plus souvent associées au syndrome de Brugada et aux troubles de conduction (Chen et al., 1998; Tan et al., 2001).

2.1.3 KCNH2 et courant I_{Kr}

2.1.3.1 Historique

Le gène hERG (*human ether-a-go-go related gene*), aujourd'hui nommé KCNH2, dérive du gène eag (*ether-a-go-go*) qui a été isolé en 1994 chez la drosophile grâce à une analyse moléculaire de mutations affectant l'excitabilité membranaire (Warmke et Ganetzky, 1994). Les auteurs ont découvert que certaines mutations situées dans un domaine particulier qui définit une famille de gènes, appelé domaine eag (ether-a-go-go), entraînaient des mouvements involontaires des pattes des drosophiles sous anesthésie à l'éther. L'étude a révélé que ce gène eag codait pour une protéine qui s'assemblait pour former un canal responsable d'un courant potassique dépendant du voltage et rectifiant dans le sens sortant.

Le gène hERG a été isolé de l'hippocampe humain après criblage avec un homologue du gène eag de la souris. Chez l'homme, il a été rapporté que le gène code pour un canal potassique avec des propriétés de rectification entrante (Trudeau et al., 1995).

2.1.3.2 Structure et synthèse du canal hERG

Chez l'homme, le gène hERG est localisé sur le chromosome 7 (région q36.1), mesure environ 33Kb, et code pour la sous-unité alpha du canal (1159 acides aminés), appelée Kv11.1. Les sous-unités alpha s'auto assemblent pour former un canal fonctionnel tétramérique (MacKinnon, 1991). Les sous-unités α sont composées de 6 segments transmembranaires (S1-S6) et des domaines N-terminal et C-terminal intracellulaires (**Figure 5**).

Une analyse de la structure par cristallographie à haute résolution a montré que le pore du canal est formé par les segments S5, S6 et la boucle extracellulaire S5-S6 (Long et al., 2007). Les segments S1-S4 forment le domaine sensible au voltage (voltage sensor domain), qui réagit aux variations de potentiel pour moduler l'ouverture et la fermeture du pore du canal (Colenso et al., 2013). Entre le segment S5 et l'hélice du pore (P-domain), on trouve le domaine « S5P linker » qui est une hélice amphipathique d'environ 40 aa. (Torres et al., 2003).

Le domaine N-terminal (env. 400 aa.) inclut le domaine Per-Arnt-Sim (PAS, aa. 26-135) composé d'hélices α et de feuillets β , dont la structure et le rôle physiologique ont été décrits par Morais Cabral et al. (Morais Cabral et al., 1998). Ce domaine définit la famille des eag, et joue un rôle très important dans la désactivation du canal. La délétion de ce domaine entraîne une accélération très importante de la désactivation (Schonherr and Heinemann, 1996; Gustina and Trudeau, 2009).

Le domaine C-terminal (env. 490 aa.) contient le domaine cNBD (cyclic nucleotide binding domain, env. 120 aa.) qui peut fixer l'AMP cyclique (AMPc). L'effet de l'AMPc reste très mineur sur hERG, en diminuant légèrement l'amplitude du courant. Par contre, l'effet de l'AMPc est potentialisé par la présence de sous-unités accessoires de hERG (Sanguinetti et al., 1995; Cui et al., 2000).

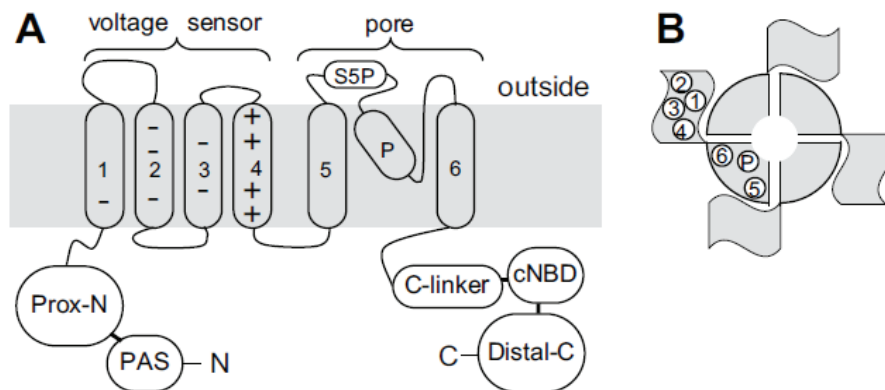


Figure 5 : Structure du canal potassique hERG.

A. Topologie prédictive d'une simple sous-unité α du canal hERG. PAS : Domaine Per-Arnt-Sim, cNBD : domaine de liaison des nucléotides cycliques, Prox-N : domaine proximal N-terminal, Distal-C : domaine distal C-terminal, S5P : lien entre domaine S5 et pore. **B.** Structure fonctionnelle en tétramère. Figure extraite de Perrin et al., 2008.

Tout comme les autres protéines destinées à être exportées à la membrane plasmique, l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) est transcrit dans le noyau des cellules et est traduit en protéine dans le réticulum endoplasmique (**Figure 6**). Les peptides synthétisés se replient sous l'action de différentes protéines chaperonnes et s'assemblent en dimères par des interactions entre les domaines N-terminaux, puis les dimères s'assemblent en tétramères (Tu and Deutsch, 1999). A ce stade, on parle de sous-unité immature (core glycosylated). Sur un western blot, cette forme

correspond à une bande de 135 KDa. Les tétramères sont ensuite transportés dans l'appareil de Golgi où ils subissent une étape complémentaire de glycosylation pour former une protéine mature de 155 KDa (fully glycosylated). La séquence protéique de hERG contient six sites consensus de N-glycosylation (Zhou et al., 1998). Les canaux matures sont ensuite exportés à la membrane des cellules. Les protéines hERG matures ont une demi-vie d'environ 10 heures. Lorsqu'elles arrivent en fin de vie, ou suite à une stimulation biologique, comme une diminution du potassium extracellulaire, les protéines seront dirigées vers la dégradation par les lysosomes ou par les protéasomes (Guo et al., 2009; Robertson, 2009).

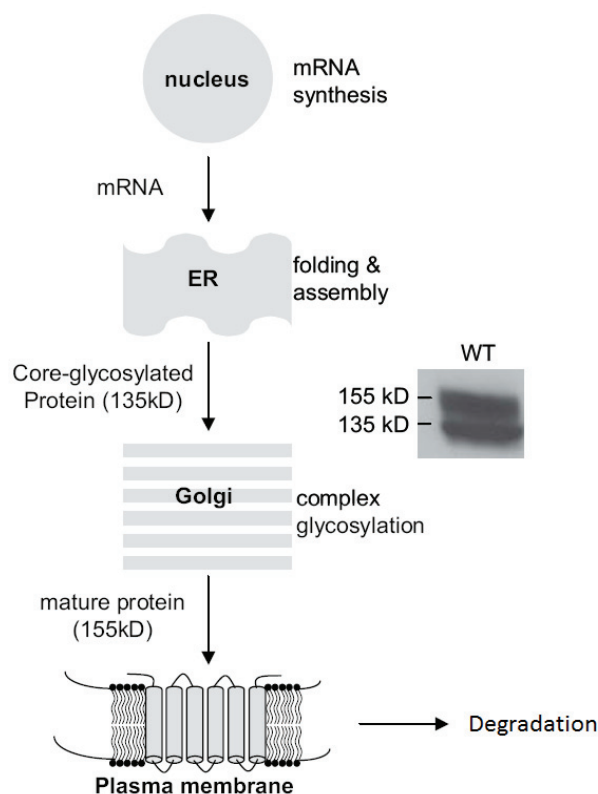


Figure 6 : Synthèse, maturation et dégradation de la protéine hERG.

Après avoir été synthétisée dans le noyau, la protéine est exportée dans le réticulum sarcoplasmique pour y être repliée puis dans l'appareil de Golgi où elle subit une étape supplémentaire de glycosylation. Les canaux fonctionnels sont ensuite exportés à la membrane. Figure extraite et modifiée de Perrin et al., 2008.

Le gène hERG contient deux sites alternatifs d'initiation de la transcription et trois sites alternatifs de terminaison (Vandenberg et al., 2012). Ainsi, par épissage alternatif, il existe 5 variants de la sous-unité alpha de hERG (**Figure 7**). Le canal hERG fonctionnel (Kv11.1 dans la nomenclature actuelle) est constitué d'un

hétérotétramère composé de ces différents variants de sous-unité α (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997). Des petites sous-unités beta accessoires (codées par les gènes KCNE1 et KCNE2) peuvent s'associer aux tétramères pour moduler le fonctionnement du canal (McDonald et al., 1997; Abbott et al., 1999).

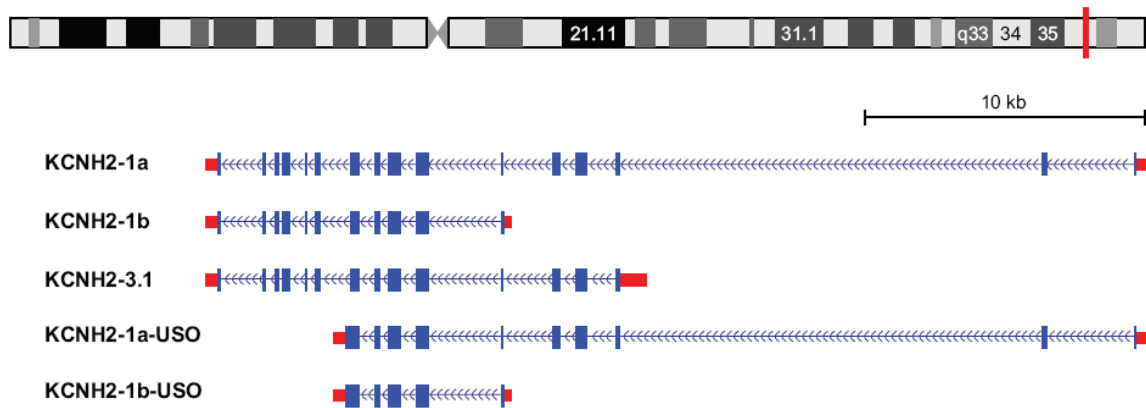


Figure 7 : Structure génomique des différents variants de sous-unité α de hERG.

La présence de deux sites alternatifs d'initiation de la transcription et de trois sites alternatifs de terminaison permet la synthèse de 5 formes différentes de la protéine. Les régions 5'UTR et 3'UTR sont représentées en rouge et les régions codantes en bleu. Figure extraite de Vandenberg et al., 2012.

2.1.3.3 Propriétés biophysiques du canal hERG

Une étude des propriétés électrophysiologiques du courant hERG a montré qu'elles sont très similaires à celles du courant I_{Kr} , un courant potassique rectifiant retardé retrouvé dans les cardiomyocytes. Le gène hERG coderait donc pour la sous-unité majeure du canal responsable du courant I_{Kr} (Sanguinetti et al., 1995). I_{Kr} est la composante rapide du courant potassique qui a pour rôle d'initier la repolarisation des cellules cardiaques (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990).

Le canal hERG évolue entre trois états conformationnels (fermé, ouvert, inactivé) en fonction de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (**Figure 8**). Le canal passe de l'état fermé à l'état ouvert lors de la dépolarisation puis s'inactive très rapidement. Lors de la repolarisation, le canal retourne à une conformation fermée en passant très brièvement par un état ouvert. Schématiquement, on dit que l'ouverture (activation) et la fermeture (désactivation)

du canal sont médiées par les mouvements de la « porte d'activation ». L'inactivation est médiée par une autre porte, appelée « porte d'inactivation ».

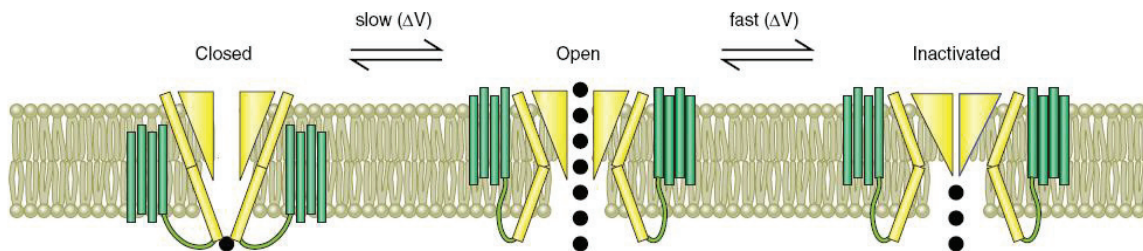


Figure 8 : Changements d'état du canal hERG.

Le canal hERG est schématisé sous les 3 états : fermé, ouvert et inactivé. La transition entre ces 3 états est dépendante du voltage. HERG est caractérisé par une activation lente et une inactivation rapide. Figure extraite de Vandenberg et al., 2012.

Contrairement aux autres canaux potassiques qui sont caractérisés par une activation rapide et une inactivation plutôt lente, hERG est caractérisé par une activation lente (entre plusieurs centaines de millisecondes et quelques secondes) et une inactivation dépendante du voltage qui est très rapide (quelques ms). La combinaison de ces deux propriétés uniques du courant hERG lui permet de jouer son rôle très important dans la repolarisation cardiaque, en déterminant la durée de la phase du plateau du potentiel d'action. Le maintien du plateau est crucial pour permettre la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique afin de déclencher la contraction cardiaque.

2.1.3.3.1 Activation et désactivation

La porte d'activation des canaux potassiques est formée par une interaction entre l'hélice localisée dans le domaine S6 de la protéine et la boucle S4-S5, ce qui bloque le pore dans l'état fermé (Thouta et al., 2014). Pour l'ouverture du canal lors de la dépolarisation, l'hélice de la porte d'activation va se tourner vers l'extérieur, ce qui dilate le pore et permet ainsi le passage des ions. Lors de la repolarisation, le canal se referme lentement (désactivation).

Dans les canaux dépendant du voltage, l'ouverture (ou la fermeture) de la porte d'activation est régulée par le VSD qui va détecter les modifications du potentiel de membrane. Au niveau du domaine S4 de hERG, on trouve 6 acides aminés basiques localisés entre les positions 525 et 538 qui joueraient un rôle très important dans la détection du potentiel de membrane (Subbiah et al., 2004). En fonction du potentiel de membrane, ces acides aminés chargés font déplacer le domaine S4 au sein de la membrane. Ce déplacement de charges peut être mesuré, c'est le courant de porte (Aggarwal and MacKinnon, 1996). Il semblerait que les mouvements du segment S4 soient responsables d'un changement de conformation de la boucle S4-S5 qui permettrait l'ouverture du canal.

Les courants de porte mesurés pour hERG montrent une constante de temps plutôt rapide, ce qui est en accord avec la vitesse d'activation (Piper et al., 2003).

Le domaine N-terminal du canal hERG joue un rôle important dans le processus de désactivation. Des études ont montré que la suppression de ce domaine induisait une accélération importante de la désactivation (Schönherr and Heinemann, 1996; Gustina and Trudeau, 2009). Cette séquence peptidique stabilise le canal dans sa conformation ouverte en interagissant avec la boucle S4-S5 (Wang et al., 2000).

2.1.3.3.2 Inactivation et levée de l'inactivation

Le phénomène d'inactivation des canaux potassiques voltage-dépendants peut résulter de deux mécanismes moléculaires différents : inactivation de type N ou de type C (Baukrowitz and Yellen, 1995). L'inactivation de type N est en général plus rapide, avec une constante de temps de l'ordre de quelques millisecondes. Elle résulte de l'occlusion du pore par le domaine N-terminal qui vient s'y replier. On parle de mécanisme « ball and chain ». L'inactivation de type C est plus lente et résulte de changements conformationnels de la partie extracellulaire du canal, ce qui peut bloquer le passage des ions. Concernant hERG, son inactivation serait analogue au type C, mais plus rapide que celle des autres canaux Kv.

La voltage-dépendance de l'inactivation n'est pas encore très bien connue. Des études suggèrent qu'elle serait parallèle à celle de l'activation avec mise en jeu du domaine S4 (Piper et al., 2003). D'autres données suggèrent un phénomène

complètement indépendant. Deux acides aminés (Ser620 et Ser631) joueraient un rôle critique dans l'inactivation en l'abolissant complètement (S620T) ou en déplaçant fortement (S631A) la variable d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisants (Ficker et al., 1998).

Lors de la repolarisation, l'inactivation est levée ce qui crée un courant de grande amplitude qui contribue à terminer la repolarisation cardiaque. On appelle ce phénomène, la levée de l'inactivation (**Figure 9**).

Le processus d'inactivation voltage-dépendante du canal hERG lui confère sa propriété de rectification entrante. Lorsqu'on dépolarise, le courant hERG augmente en amplitude jusqu'à un maximum atteint vers 0 mV, puis diminue progressivement donnant à la courbe I/V (courant en fonction du voltage) une allure en cloche caractéristique de hERG (Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995) (**Figure 10**).

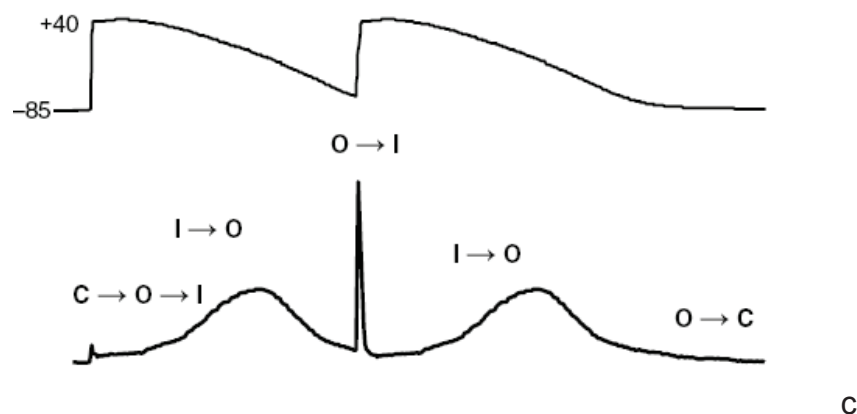


Figure 9 : Courant hERG enregistré dans des cellules CHO en réponse à un potentiel d'action.

Durant la repolarisation du premier potentiel d'action, le courant augmente, suite à la levée de l'inactivation, puis diminue car le gradient électrochimique diminue. A la fin du premier potentiel d'action, la quasi-totalité des canaux sont restés dans un état ouvert. Ainsi, une légère stimulation va induire un large courant qui va très vite s'inactiver. Figure extraite de Vandenberg et al., 2012.

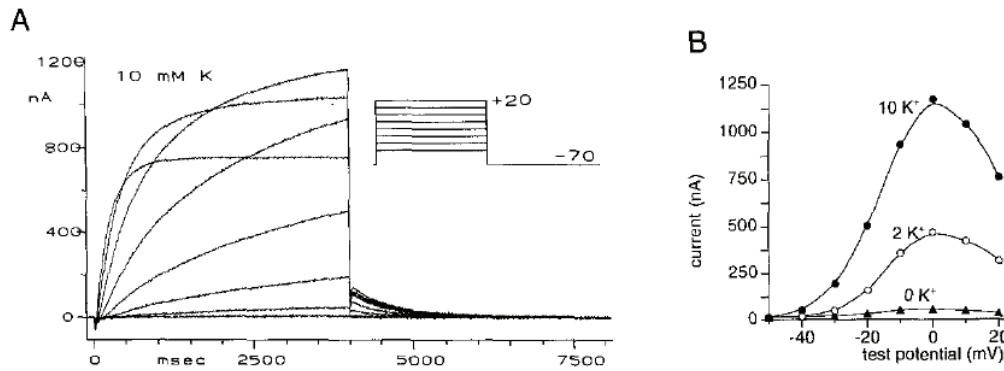


Figure 10 : Allure caractéristique du courant hERG.

A. Tracé du courant obtenu en réponse à un créneau de voltage dépolarisant de 4 secondes.

B. Courbe I/V en fonction du potassium extracellulaire. Figure modifiée de Sanguinetti et al., 1995.

2.1.3.3.3 Modélisation du courant hERG

Wang et al. ont proposé différents modèles mathématiques rendant compte de l'activation du courant hERG (Wang et al., 1997). Le meilleur, en adéquation avec les données, suggère que les canaux hERG passent successivement par 3 états fermés différents, avec des constantes de temps qui leur sont propres, avant d'être dans un état ouvert, puis dans un état inactivé.

A partir de cet état inactivé, les canaux peuvent retourner directement dans une configuration fermée ou bien passer brièvement par un état ouvert (Kiehn et al., 1999) (**Figure 11**).

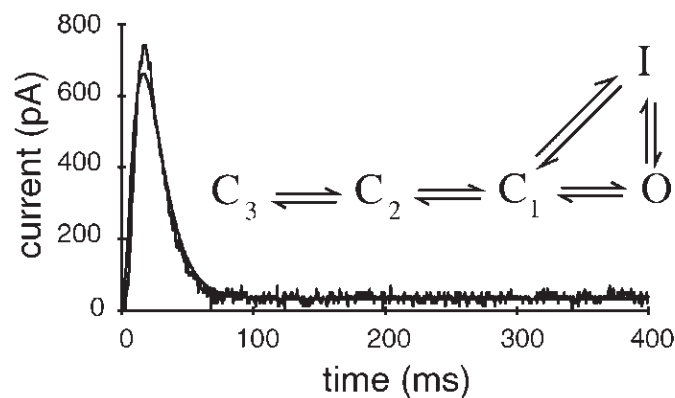


Figure 11 : Modèle multi-états du canal hERG.

Modèle rendant compte des cinétiques du courant hERG. Figure modifiée de Kiehn et al., 1999.

2.1.3.3.4 Sélectivité ionique

Le canal Kv11.1 est un canal très sélectif au potassium par rapport au sodium ($pK/pNa > 100/1$) (Sanguinetti et al., 1995).

Les alignements de séquence de la région du pore des canaux potassiques ont révélé la présence d'une séquence hautement conservée : la séquence GYG. Dans les canaux eag et notamment dans le canal hERG, le résidu tyrosine (Y) est remplacé par un résidu phénylalanine (F). Les travaux d'Heginbotham et al. (Heginbotham et al., 1992, 1994) ont montré que cette séquence GYG (ou GFG) jouait un rôle très important dans la sélectivité ionique du canal et permettait ainsi à hERG d'être plus perméable au potassium qu'au sodium. Cette séquence, appelée filtre de sélectivité est située en amont du domaine S6 juste au-dessus du pore.

2.1.3.3.5 Pharmacologie

Le canal hERG fixe un très grand nombre de molécules chimiques de différentes classes et structures. Par exemple, il peut être bloqué par de faibles concentrations d'ions tels que le césium ou le barium ($IC_{50} = 0,6 \text{ mM}$) (Trudeau et al., 1995), ou bien par des molécules beaucoup plus grosses comme le dofétilide ($IC_{50} = 3,9 \text{ nM}$ (Carmeliet, 1992)) ou l'inhibiteur spécifique E4031 ($IC_{50} = 7,7 \text{ nM}$ (Zhou et al., 1998)). Toutes les molécules qui peuvent bloquer hERG sont potentiellement arythmogènes. Ainsi, depuis 1997, l'une des recommandations des agences de sécurité du médicament (Agence européenne des médicaments) est de tester systématiquement l'effet de toute molécule en cours de développement préclinique sur le canal hERG.

Il semblerait qu'au moins deux acides aminés localisés dans la cavité du pore, joueraient un rôle fondamental dans la fixation des différentes molécules. Des expériences de mutagenèse dirigée en résidus alanine ont révélé que la tyrosine Y652 et la phénylalanine F656, toutes les deux localisées au niveau du domaine S6, et uniques aux canaux eag/erg, étaient responsables de la haute affinité de nombreuses molécules (Mitcheson et al., 2000a).

2.1.3.4 Les altérations du courant hERG

Des modifications de la séquence nucléotidique de hERG, dues à des mutations, peuvent engendrer des dysfonctionnements du canal ionique.

L'amplitude et les cinétiques du courant dans les myocytes cardiaques sont déterminées par trois paramètres : le nombre total de canaux présents à la membrane plasmique, la probabilité d'ouverture de chaque canal ainsi que la conduction unitaire de chaque canal.

Des mutations de hERG (ou bien certaines molécules chimiques) peuvent avoir pour effet de diminuer (perte de fonction) ou d'augmenter (gain de fonction) l'amplitude du courant. A ce jour, plus de 800 mutations ont été référencées chez différents patients (données personnelles). On peut classer ces mutations en 4 catégories selon leur effet (Delisle et al., 2004):

- classe 1 : entraîne une anomalie de la synthèse de la protéine. De nombreuses mutations entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré et conduisent à la formation d'une protéine tronquée qui peut être plus ou moins fonctionnelle en fonction de la position du codon stop (Teng et al., 2004; Christe et al., 2008; Gong et al., 2011; Stump et al., 2013).
- classe 2 : entraîne une altération du repliement et/ou de l'adressage des protéines à la membrane plasmique. Une grande majorité des mutations qui sont pathologiques, le sont à cause de ce défaut (Sanders and Myers, 2004). Les protéines sont correctement synthétisées mais ne suivent pas le processus de maturation et sont retenues dans le réticulum ou dans l'appareil de Golgi. Sur un western blot, on observe alors principalement une seule bande de 135 KDa (January et al., 2000; Anderson et al., 2006; Gianulis and Trudeau, 2011).
- classe 3 : entraîne un dysfonctionnement de la probabilité d'ouverture du canal. Certaines mutations peuvent induire des modifications des cinétiques ou de la voltage-dépendance de l'activation, de la désactivation ou de l'inactivation du canal (Bian et al., 2004; Chevalier et al., 2007; Wynia-Smith et al., 2008).
- classe 4 : entraîne un dysfonctionnement de la perméabilité du canal. Il a été décrit des mutations qui altéreraient la sélectivité ionique du canal ou bien

leur conductance (Lees-Miller et al., 2009; Es-Salah-Lamoureux et al., 2011; Amoros et al., 2011).

2.1.4 HCN4 et courant I_f

L'activation du courant I_f (funny current) est l'un des mécanismes majeurs du pacemaker des cellules cardiaques du nœud sinusal qui entraîne leur dépolarisation lente afin d'initier le potentiel d'action qui se propage ensuite au reste du cœur (DiFrancesco et al., 1986). C'est un courant qui s'active lors de l'hyperpolarisation. Un courant similaire (I_h), aussi activé par l'hyperpolarisation, a été décrit dans différents types de neurones (Pape, 1996).

2.1.4.1 Historique

Le courant I_f a été découvert dans le nœud sino-atrial en 1979 (Brown et al., 1979), mais c'est dans les années 1990 que le premier clone du canal a été proposé (Santoro et al., 1998). Les études suivantes ont montré qu'il existe en fait quatre isoformes du gène codant pour plusieurs sous-unités alpha formant une nouvelle famille de canaux ioniques, activés par l'hyperpolarisation : HCN1 à HCN4 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels), ayant des propriétés et une régionalisation tissulaire différentes. Dans le cœur des mammifères, les isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 sont exprimées dans le NSA, l'atrium, le nœud atrio-ventriculaire et le système de conduction His–Purkinje (Shi et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Moosmang et al., 2001). La quantification des ARNm (Chandler et al., 2009) montre qu'au niveau de l'atrium droit, les isoformes HCN4 et HCN2 prédominent avec respectivement 64% et 24% des ARNm HCN totaux. Au niveau du NSA, ce sont les isoformes HCN4 et HCN1 qui sont les plus abondantes (respectivement 84% et 14% des ARNm HCN totaux).

L'isoforme HCN4 est la composante majeure du courant de pacemaker I_f , alors que les isoformes HCN1 et HCN2 jouent un rôle mineur dans les conditions physiologiques.

2.1.4.2 Structure

D'après leur séquence, les canaux HCN ont été classés comme appartenant à la superfamille des canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) et des canaux activés par les nucléotides cycliques (cyclic nucleotide-gated channels : CNG).

Le gène hHCN4, localisé sur le chromosome 15q24-25, code pour une protéine de 1203 acides aminés qui va s'assembler en tétramère pour former le canal fonctionnel. La protéine HCN4 est aussi capable de s'assembler en hétérotétramères avec des sous-unités codées par les gènes HCN1, HCN2 et HCN3 (Much et al., 2003).

Chaque sous-unité possède six segments transmembranaires (S1 à S6) dont le segment S4 contient des résidus aminés chargés qui détectent le potentiel membranaire (domaine voltage-sensor). Le domaine du pore est constitué des segments S5 et S6 et de la boucle S5-S6 (**Figure 12**). Tout comme les canaux potassiques voltage-dépendants, les canaux HCN possèdent une séquence GYG dans le domaine du pore, qui leur confère leur sélectivité ionique. Au sein de leur domaine C-terminal, on retrouve un domaine cNBD, homologue à celui des canaux CNG, qui est relié au segment S6 par un domaine formant une hélice α , le C-linker (env. 90 aa.).

Des sous-unités régulatrices peuvent interagir avec les canaux HCN pour moduler leur fonctionnement, comme la protéine MiRP1 codée par le gène KCNE2 (Yu et al., 2001; Gravante et al., 2004; Michels et al., 2008).

Les protéines HCN4 synthétisées dans le réticulum endoplasmique subissent une étape de maturation (N-glycosylation) très similaire à celle des protéines hERG (voir chapitre 2.1.3.2), avant de pouvoir être exportées à la membrane et former un canal fonctionnel (Much et al., 2003). Sur un western blot, on identifie alors deux bandes : l'une à 145 KDa et l'autre à 155 KDa.

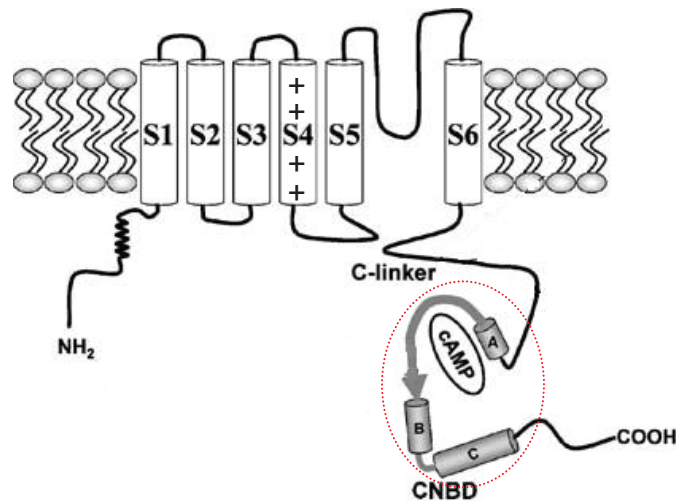


Figure 12: Structure de la protéine HCN4.

La sous-unité α de HCN4 est composée de six domaines transmembranaires (S1 à S6), d'une extrémité N-terminale et d'une extrémité C-terminale, toutes deux intra-cytoplasmiques. Le domaine C-terminal comprend le C-linker et le cNBD (cerclé en pointillés rouges) qui est capable de fixer l'AMPc. Figure extraite de Herrmann et al., 2007.

L'alignement des séquences des différentes isoformes HCN montre une très haute conservation (>80%) de la région du « core » (domaines transmembranaires + cNBD), alors que les séquences nucléotidiques des domaines N- et C-terminaux diffèrent largement (**Figure 13**). Il a été suggéré que ces régions terminales étaient responsables des différences observées dans les propriétés biophysiques de chaque isoforme (Viscomi et al., 2001).

hHCN1	-----MEGGGKPNSSS	11
hHCN2	-----MDARGGGGRPGESPGASPTTGPPIPPPPPPPPKQPPPPPPAPPAGPGAPPQHPFRAEALPPEADEGGPRGRLLRS	77
hHCN3	-----	-
hHCN4	MDKLPPSMRKRLYSLPQVQGAWIMDEEEDAEDEAGGRQDPSRRSIRLRPLSPSPSAAAGGTESRSSALGAADSEGPARGAGKSSTNGDCRRFRGSLAS	102
hHCN1	NSRDDGNSVFPKAKSATGAGPAAAEKFLG-----TFPGGGGAGAKEHGNSVCFKVDGGGGGGGGGGGEEPAAGGFDAEGPRR-----	89
hHCN2	RDSSCGRPPTGAASTAKGSPNGECGRG-----EPQCSFAGPEGPARGPK---VSFSCRGAASGPAPGPGPAEEAGSSEAGPAGE-----	155
hHCN3	-----MEAEQR-----LAEVPPVAPPATAASGPPIKSGPEP-----	44
hHCN4	LGSRGGGSGGTGSGSSHGHLDHSAEERRLIAEGDASPGEDRTPPGLAAPERPE-----GASAQPAASPPPQPPQPASASCEQPSVDTAIVKEGGA	194
hHCN1	-----QYGFMOQFQTSMLQPGVNKFSLRMFGSQKAVEKEQERVKTACFWIIHPYSDFRFYWDLIMLLMVGNLVIIPVGITFFTEQTTTPWI	176
hHCN2	-----RGSQASFMQRFQFALLQPGVNKFSLRMFGSQKAVEREQERVKSAGAWIIHPYSDFRFYWDTMILLFMVGNLIIIPVGITFFKDETTAPWI	245
hHCN3	-----KRHLGLTLLQPTVNKFSLRVFGSHKAVETQERVKSAGAWIIHPYSDFRFYWDLIMLLFMVGNLIIIPVGITFFKEENSPWI	127
hHCN4	AAGDQILPEAEVRLGQAGFMQRFQFAMLQPGVNKFSLRMFGSQKAVEREQERVKSAGFWIIHPYSDFRFYWDLTMLLLMVGNLIIIPVGITFFKDETTAPWI	296
S1		
hHCN1	IFNVASDITVFLDLIMNFRGTNNDSSSEIILDPKVIKMNYSKSWFVVDFISSIPVDYIPLIVEKG--IDSEVYKTARALRIVRFTKILSLLRLLRLSRLIR	276
hHCN2	VFNVSDDTFFLLMDLVNFRGTGIVINDTEIILDPKVIKMNYSKSWFVVDFISSIPVDYIPLIVEKG--IDSEVYKTARALRIVRFTKILSLLRLLRLSRLIR	345
hHCN3	VFNVSDDTFFLLMDLVNFRGTGIVINDTEIILDPKVIKMNYSKSWFVVDFISSIPVDYIPLIVEKG--IDSEVYKTARALRIVRFTKILSLLRLLRLSRLIR	229
hHCN4	VFNVSDDTFFLLMDLVNFRGTGIVINDTEIILDPKVIKMNYSKSWFVVDFISSIPVDYIPLIVEKG--IDSEVYKTARALRIVRFTKILSLLRLLRLSRLIR	396
S2 S3 S4		
hHCN1	YIHQWEEIFHMTYDLASAVVRIIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPLLDQFFPDCCVNSLNEVMNDSWGKQYSYALFKAMSHMLCIGYGAQAFVMSMDLWITMLS	378
hHCN2	YIHQWEEIFHMTYDLASAVVRIIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPLLDQFFPDCCVNSLNEVMNDSWGKQYSYALFKAMSHMLCIGYGAQAFVMSMDLWITMLS	447
hHCN3	YIHQWEEIFHMTYDLASAVVRIIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPLLDQFFPDCCVNSLNEVMNDSWGKQYSYALFKAMSHMLCIGYGAQAFVMSMDLWITMLS	331
hHCN4	YIHQWEEIFHMTYDLASAVVRIIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPLLDQFFPDCCVNSLNEVMNDSWGKQYSYALFKAMSHMLCIGYGAQAFVMSMDLWITMLS	498
S5		
hHCN1	MIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYQVEQYMSFHKLPADTRQRIHDIYEHRYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFCRKLVAISMPFANAD	480
hHCN2	MIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYQVEQYMSFHKLPADTRQRIHDIYEHRYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFCRKLVAISMPFANAD	549
hHCN3	MIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYQVEQYMSFHKLPADTRQRIHDIYEHRYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFCRKLVAISMPFANAD	433
hHCN4	MIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYQVEQYMSFHKLPADTRQRIHDIYEHRYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFCRKLVAISMPFANAD	600
S6		
hHCN1	PNFVTAMLSKLRFEVFPQGDYIIREGAVGKKMYFIQHGVSGLTKGNETKLADGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSDVNFNEVLEEYPMRRA	582
hHCN2	PNFVTAMLSKLRFEVFPQGDYIIREGAVGKKMYFIQHGVSGLTKGNETKLADGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSDVNFNEVLEEYPMRRA	651
hHCN3	PNFVTAMLSKLRFEVFPQGDYIIREGAVGKKMYFIQHGVSGLTKGNETKLADGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSDVNFNEVLEEYPMRRA	535
hHCN4	PNFVTAMLSKLRFEVFPQGDYIIREGAVGKKMYFIQHGVSGLTKGNETKLADGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSDVNFNEVLEEYPMRRA	702
CNBD		
hHCN1	FETVAIDRLDRIGKKNISILLQFQKDLNTGVFNNOENELIKQIVKHDEMVQAIAPINYPQMTTLNSTSTTPTSRMRTSPPVYTATSLSHSNLHS----	680
hHCN2	FETVAIDRLDRIGKKNISILLQFQKDLNTGVFNNOENELIKQIVKHDEMVQAIAPINYPQMTTLNSTSTTPTSRMRTSPPVYTATSLSHSNLHS----	748
hHCN3	FETVAIDRLDRIGKKNISILLQFQKDLNTGVFNNOENELIKQIVKHDEMVQAIAPINYPQMTTLNSTSTTPTSRMRTSPPVYTATSLSHSNLHS----	627
hHCN4	FETVAIDRLDRIGKKNISILLQFQKDLNTGVFNNOENELIKQIVKHDEMVQAIAPINYPQMTTLNSTSTTPTSRMRTSPPVYTATSLSHSNLHS----	804
hHCN1	-----PSPSTQTPQP-----SAILLS-----	695
hHCN2	-----PLALGSP-----RLVR-----	759
hHCN3	---RGP-----LPLSPDSP-----ATLLA-----	643
hHCN4	IFRPPPGSGGLGNLQAGQTPRHLKRLQSLIPALGSASPASSPSQVDTSSSSSFHIQQLAGFSAPAGLSPLPSSSSPPPGACGSPSAPTSPAGVAATTAG	906
hHCN1	-----PCSYTTAVCSFPVQSPLAARTFHYASPTASQLSLMQ-----QQPQQQ-----	737
hHCN2	-----RPPPGPAPAAASPG-----PPPPASPP-----GAPASP-----	787
hHCN3	-----RSARWSAGSPAS-----LVPVRAGPWASTS-----RLPAPP-----	675
hHCN4	FGHFHKGALGGLSSSDSPLLTPLQPGARSPQAAQSPAPPARGGLGLPEHFLPPPPSSSRSPSSSPGLQGPFGELSLGLATGPLSTPETPQPQEPFSLVA	1008
hHCN1	-----VQSQPQPQTQPPQSPQFQTPGSSSTPKNEVHKSTQALHNTNLTRVVRPFSAWQPSLPHEVSTLISRPHTVG-----	809
hHCN2	-----RAPRTSPYGGGLPAAPLAGP-----ALPARRLSR-----ASRP-----LSASQPSLPHG-----	830
hHCN3	-----ARTLHASLSRAGRSQVSLGPPPGGGGRRLLGP-----RGRF-----LSASQPSLPQR-----	722
hHCN4	GASGGASPVGFTPRGGLSPPGHSPGPPRTFSPASPPRASGSHGSLLEPPASSPPPPQVPPQRRGTPEPLTPGRLTQDLKLISSAQALPDQAQTLRRASPHSSG	1110
hHCN1	---ESLASIPQPVTAVPCTGLQAG-----GRSTVPQRVTLPKQSSGAIPPENRGVPPAPPPPPAAALPRESSSVLNTDPDAEKPR---FASNL	890
hHCN2	-----APGPAAST-----KPASSSTPRLGPTPAARAAAPSPDRRDSASPGAAGGLDPQDSARSRLSSNL	889
hHCN3	-----ATGDSFG-----KKGSGSERLPPSGLLAK-----PPRTAQPPRPVPEPATPRGLQLSANM	774
hHCN4	ESMAAFPLFPRAGGSGSGSGSGGLGPPGRPYGAIPGQHVTLPEKTSKSGSLPPLSLFGARATSSGGPPLTAGQREFGARPEPVR-SKLPSNL	1203

Figure 13 : Séquences nucléotidiques des sous-unités HCN1 à HCN4 humaines.

Alignement des séquences primaires des 4 isoformes humaines de HCN. En vert, les acides aminés conservés entre toutes les isoformes, en jaune, ceux hautement conservés. Figure extraite de Baruscotti et al., 2005.

2.1.4.3 Propriétés biophysiques

Le courant HCN4 est caractérisé par une activation par hyperpolarisation, de lentes cinétiques d'activation et de désactivation, une double perméabilité sodique et potassique et une forte modulation par l'AMPc.

2.1.4.3.1 Activation et désactivation

Comme les autres canaux voltage-dépendants, HCN4 possède un domaine sensible au voltage (acides aminés chargés localisés dans le segment S4). Lors de l'hyperpolarisation, le mouvement du segment S4 dans le champ électrique exerce une action en tirant sur la boucle S4-S5 qui vient alors interagir directement avec la porte d'activation localisée au niveau du segment S6 (Chen et al., 2001; Prole and Yellen, 2006). Le canal va ainsi s'ouvrir et permettre une entrée de potassium et de sodium qui dépolarise la cellule. Cette dépolarisation va ensuite désactiver le canal qui revient à sa conformation de repos.

2.1.4.3.2 Sélectivité ionique

Bien que le motif GYG localisé dans le domaine du pore soit une caractéristique des canaux potassiques, il a été montré que le canal HCN4 était pourvu d'une perméabilité mixte au sodium et au potassium ($pNa/pK = 0,27$) avec un potentiel d'inversion mesuré entre -10 et -20 mV (DiFrancesco, 1981). Il a été suggéré que l'extrémité interne du pore du canal HCN4 serait bien moins rigide que celle des autres canaux potassiques, ce qui pourrait expliquer le passage des ions sodium, de taille plus importante que les ions potassium (Giorgetti et al., 2005).

2.1.4.3.3 Modulation par le système nerveux autonome

Chez les mammifères, la région du nœud sinusal est richement innervée par des fibres du système nerveux autonome qui exercent un contrôle direct sur l'activité

pacemaker. La stimulation sympathique, via les récepteurs β adrénergiques, élève la fréquence cardiaque alors que la stimulation parasympathique, via les récepteurs muscariniques, l'abaisse.

La participation de la modulation du courant I_f au contrôle du rythme est causée par des variations de concentration en AMPc intracellulaire. L'adrénaline va stimuler la synthèse d'AMPc, via l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui exerce un effet chronotrope positif en induisant un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs (DiFrancesco et al., 1986). Ce décalage peut aller jusqu'à 10 ou 15 mV en fonction de la concentration en AMPc (DiFrancesco and Tortora, 1991; Milanesi et al., 2006).

L'AMPc entraîne aussi une accélération de l'activation et un ralentissement de la désactivation (Duhme et al., 2012). Ces différents mécanismes concourent à augmenter le courant I_f entrant et donc à augmenter la pente de dépolarisation lente des cellules du nœud sino-atrial. Les potentiels d'action sont générés plus rapidement et la fréquence cardiaque est accélérée. L'action opposée de la stimulation muscarinique passe par une inhibition de la synthèse en AMPc (DiFrancesco and Tromba, 1988).

Le mode d'action de l'AMPc a été étudié, et il semblerait qu'il exerce son action seulement par fixation directe sur le canal et non via des phosphorylations de certains acides aminés du canal (DiFrancesco and Tortora, 1991). La fixation de l'AMPc entraîne un changement de conformation des extrémités C-terminales qui stabilisent la conformation ouverte du canal.

Une étude récente (Lolicato et al., 2014) a mis en évidence la présence d'un site de fixation aux dinucléotides cycliques, une classe émergente de seconds messagers chez les mammifères, au sein du domaine C-linker de HCN4. La fixation de ces molécules va contrer la régulation des canaux HCN4 par l'AMPc et réduit ainsi la fréquence cardiaque jusqu'à 30%.

Il a été montré que l'AMPc, en concentration saturante, peut favoriser la tétramérisation des domaines cytoplasmiques C-terminaux des canaux. Il semblerait que les domaines cNBD exercent une inhibition tonique sur le pore du canal, qui serait levée par leur changement de conformation et leur assemblage en tétramère. Ceci tend alors à augmenter le courant I_f (Lolicato et al., 2011).

2.1.4.3.4 Pharmacologie

Le blocage spécifique du courant I_f est une approche directe pour diminuer la fréquence cardiaque sans avoir d'autres effets cardiovasculaires collatéraux.

Le canal est bloqué par le césium extracellulaire à faible concentration (0,1-5 mM) (Denyer and Brown, 1990), mais ni par le baryum à 2 mM ni par le tétraéthylammonium (TEA) à 20 mM, deux bloqueurs classiques des canaux potassiques (Ludwig et al., 1999).

L'ivabradine (Procoralan®; Laboratoires Servier) est le premier membre de la famille des bradycardisants, bloqueurs de I_f , approuvé par l'Agence Européenne d'Evaluation Médicale en 2005 pour le traitement de l'angine de poitrine et de l'insuffisance cardiaque. De grandes études multicentriques sur plusieurs milliers de personnes (BEAUTIFUL, SHIFT) ont montré un effet bénéfique de la prise d'ivabradine chez des patients atteints de dysfonction ventriculaire gauche, de maladie coronaire ou encore d'insuffisance cardiaque (Fox et al., 2008a, 2008b; Swedberg et al., 2010).

Le blocage spécifique de I_f par l'ivabradine a été démontré en 1996 avec une IC50 de 2,8 μ M (Bois et al., 1996). D'autres études situent l'IC50 entre 0,5 et 4,5 μ M (Bucchi et al., 2002; Thollon et al., 2007; Postea and Biel, 2011).

Son mécanisme d'action a été étudié (**Figure 14**). L'ivabradine doit d'abord passer à travers la membrane cellulaire, car elle ne peut bloquer les canaux HCN que depuis le compartiment intracellulaire et seulement lorsque le pore est ouvert lors de l'hyperpolarisation (Bois et al., 1996).

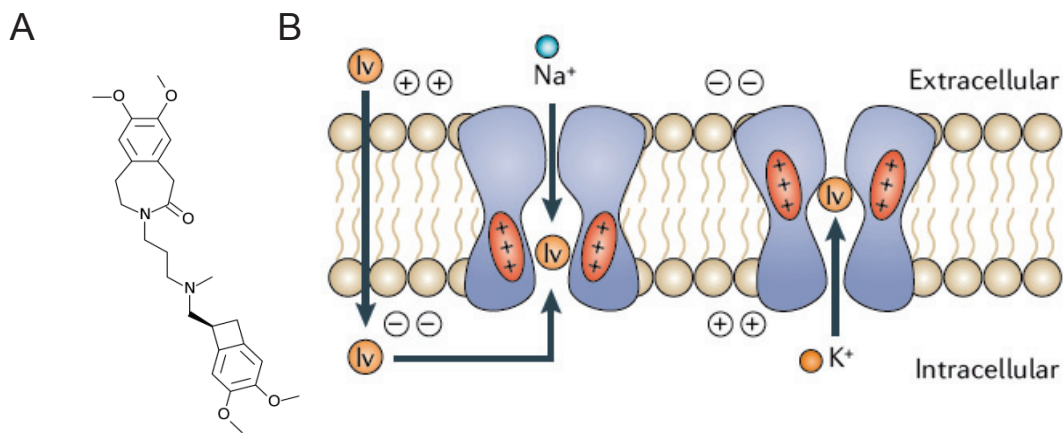


Figure 14 : Ivabradine et canaux HCN.

A. Structure moléculaire de l'ivabradine. **B.** Mode d'action de l'ivabradine sur les canaux HCN. L'ivabradine va diffuser dans les cellules à travers la bicouche lipidique. Le blocage se fait seulement du côté intracellulaire lorsque le canal est dans un état ouvert. Figure extraite de Postea et Biel, 2011.

Une étude de mutagenèse dirigée a montré l'importance des résidus aminés Y506, F509 et I510, localisés au niveau du segment S6 de la protéine, dans le blocage des canaux HCN4 par l'ivabradine (**Figure 15**) (Bucchi et al., 2013).

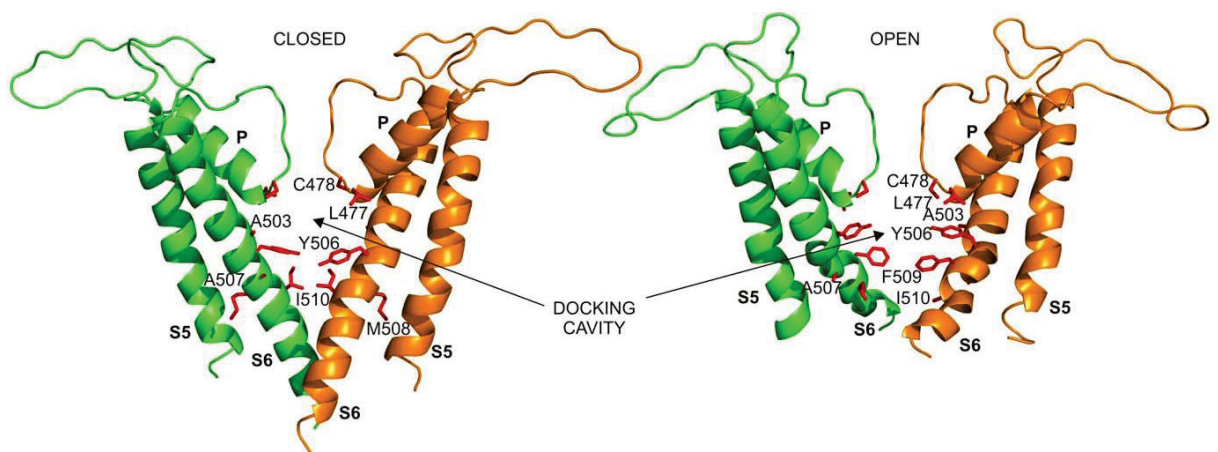


Figure 15 : Site de fixation de l'ivabradine.

Une modélisation moléculaire en 3 dimensions présente le site de fixation de l'ivabradine sur le canal HCN4 fermé ou ouvert. Figure extraite de Bucchi et al., 2013.

2.1.4.3.5 Pathophysiologie

Les études des canalopathies liées à HCN4 montrent que les mutations créant une perte de fonction du courant I_f , soit par un défaut d'adressage des protéines à la membrane, soit par une altération des propriétés biophysiques du canal, sont associées à des troubles du rythme cardiaque, en particulier à une bradycardie sinusale (Verkerk and Wilders, 2015). Une étude d'association de gènes sur près de 60 000 individus a récemment mis en évidence que HCN4 pourrait être un gène candidat à la survenue de la FA (Ellinor et al., 2012).

A ce jour, un peu moins de 30 mutations de HCN4 ont été décrites chez l'homme, et potentiellement associées à des pathologies cardiaques telles que des dysfonctionnements du nœud sinusal, des épisodes de FA, des cardiomyopathies ventriculaires avec non-compaction et des blocs atrio-ventriculaires (**Figure 16** et **Tableau 1**).

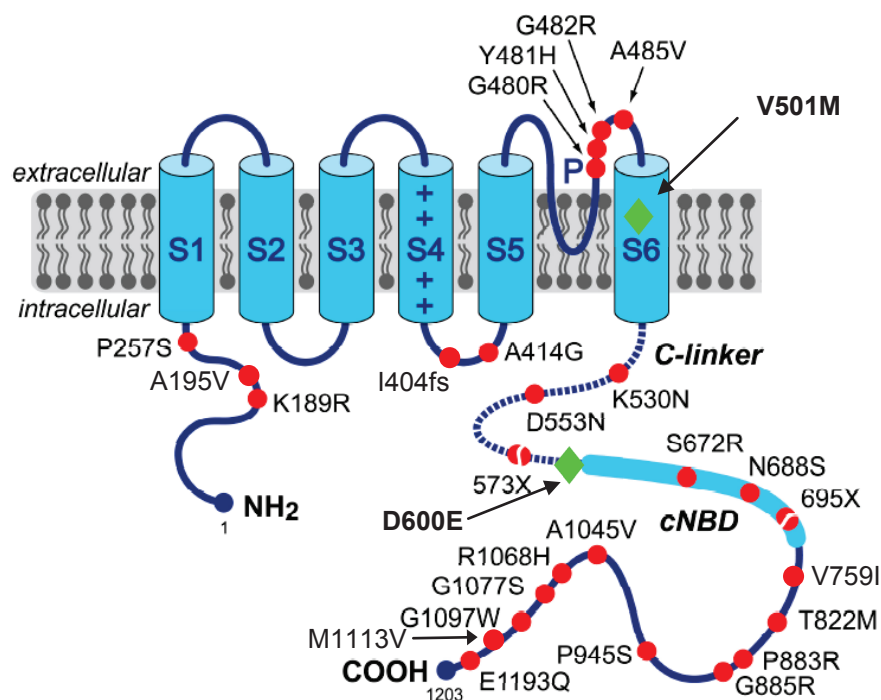


Figure 16 : Mutations du gène HCN4.

Vue d'ensemble et position des mutations de HCN4 identifiées chez différents patients et répertoriées dans la littérature à ce jour. Figure modifiée de Verkerk and Wilders, 2015. Les losanges verts symbolisent les deux mutations étudiées dans notre travail.

Tableau 1 : Mutations du gène HCN4 publiées dans la littérature.

Mutation	Localisation protéique	Phénotype des patients	Fq allélique (ExAC)	Caractéristiques biophysiques	Références
p.Lys189Arg K189R	N-term	FA	0,00001048	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Ala195Val A195V	N-term	BS + MS enfant	0,0003807	Pas d'étude fonctionnelle	(Evans et al., 2013)
p.Pro257Ser P257S	N-term	FA paroxysmique qui devient permanente. Dysfonction sinusale	ND	Défaut d'adressage et pas de colocalisation avec le WT	(Macri et al., 2014)
p.Ile404fs I404fs	S4-S5	TV idiopathique Elévation du segment ST	ND	Pas d'étude fonctionnelle	(Ueda et al., 2009)
p.Ala414Gly A414G	S4-S5 linker	Bradycardie CMVG avec NC	ND	Décalage négatif de la courbe d'activation en hétérozygote (-25 mV). Diminution de la densité de courant dans les valeurs de potentiel physiologiques	(Milano et al., 2014)
p.Gly480Arg G480R	Pore	BS	ND	Densité de courant diminué chez le mutant seul. Défaut d'adressage à la membrane.	(Nof et al., 2007)
p.Tyr481His Y481H	Pore (séquence GYG)	BS CMVG avec NC	ND	Décalage négatif de la courbe d'activation en hétérozygote (-50 mV). Diminution de la densité de courant dans les valeurs de potentiel physiologiques	(Milano et al., 2014)

p.Gly482Arg G482R	Pore (séquence GYG)	Dysfonction sinusale CMVG avec NC	ND	Décalage négatif de la courbe d'activation en hétérozygote (-45mV). Diminution de la densité de courant dans les valeurs de potentiel physiologiques. Pas de courant du mutant seul : canaux à la membrane mais non fonctionnels	(Milano et al., 2014; Schweizer et al., 2014)
p.Ala485Val A485V	Pore	BS	ND	Densité de courant diminué chez le mutant seul et intermédiaire chez l'hétérozygote. Défaut d'adressage à la membrane.	(Laish-Farkash et al., 2010)
p.Lys530Asn K530N	C-linker	Tachycardie - Bradycardie FA persistante	ND	Décalage négatif courbe d'activation pour mélange uniquement (-13 mV). Facilitation de l'effet de l'AMPc chez le mélange (plus grand shift). Pas de modification des constantes de temps d'activation et de désactivation en condition basale	(Duhme et al., 2012)
p.Asp553Asn D553N	C-linker	Dysfonction sinusale TV, TdP	0,00002472	Forte diminution du courant pour le mutant seul et intermédiaire pour le mélange. Pas de modification de la courbe d'activation. Accélération activation et ralentissement désactivation. Défaut d'adressage à la membrane.	(Ueda et al., 2004)
p.Leu573X L573X	C-linker	Dysfonction sinusale FA intermittente	ND	Perte de l'effet de l'AMPc sur la courbe d'activation. Activation inchangée. La désactivation devient exponentielle et non sigmoïdale	(Schulze-Bahr et al., 2003)
p.Ser672Arg S672R	cNBD	BS	ND	Décalage négatif de la courbe d'activation du mutant seul (-8mV). Accélération de la désactivation. Effet intermédiaire pour le mélange. Pas de modification de l'effet de l'AMPc. Constante de temps d'activation inchangée	(Milanesi et al., 2006)
p.Asn688Ser N688S	cNBD	Sujet contrôle	0,00009927	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Glu695X E695X	cNBD	BS	ND	Perte de l'effet de l'AMPc sur la courbe d'activation, et sur les constantes de temps d'activation et de désactivation du mutant seul et du mélange	(Schweizer et al., 2010)

p.Val759Ile V759I	C-term	BS + MS enfant	0,003533	Pas d'étude fonctionnelle	(Evans et al., 2013)
p.Thr822Met T822V	C-term	FA	0,0004400	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Pro883Arg P883R	C-term	BS, FA paroxystique, CMVG avec NC	0,008767	Pas d'étude fonctionnelle	(Schweizer et al., 2014)
p.Gly885Arg G885R	C-term	FA	0,00002164	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Pro945Ser P945S	C-term	FA	0,00007736	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Ala1045Val A1045V	C-term	Sujet contrôle	ND	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Arg1068His R1068H	C-term	Sujet contrôle	ND	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Gly1077Ser G1077S	C-term	FA	0,00004992	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)
p.Gly1097Trp G1097W	C-term	BAV	0,00005045	Diminution densité de courant de 50%. Décalage négatif courbe d'activation du mutant seul, et intermédiaire pour le mélange. Accélération désactivation. Constante de temps d'activation non étudiée	(Zhou et al., 2014)

p.Met1113Val M1113V	C-term	BS + MS enfant	0,02475	Pas d'étude fonctionnelle	(Evans et al., 2013)
p.Glu1193Gln G1193Q	C-term	FA	0,0009853	Mutant seul pas différent du WT	(Macri et al., 2014)

FA : fibrillation atriale, BS : bradycardie sinusale, TV : Tachycardie ventriculaire, CNVG : Cardiomyopathie ventriculaire gauche, TdP : Torsades de pointes, BAV : Bloc atrio-ventriculaire, MS : mort subite, NC : non-compaction.

Les fréquences alléliques ont été exportées de la base de données ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) qui répertorie les variants identifiés par différentes études génétiques sur plus de 60000 individus. Concernant le gène HCN4, 792 variants sont répertoriés à ce jour. ND : non déterminé.

2.2 Troubles du rythme cardiaque et canalopathies

Les canalopathies sont l'ensemble des pathologies qui ont un rapport direct avec un dysfonctionnement des canaux ioniques.

La durée et l'allure du potentiel d'action cardiaque résultent de changements d'amplitude des courants ioniques à travers les différents canaux présents dans la membrane. Des modifications du fonctionnement de ces différents canaux peuvent conduire à la genèse d'un potentiel d'action potentiellement pathogène.

2.2.1 Le syndrome du QT long

Le syndrome du QT long (SQTL) se traduit par un allongement de la distance entre les ondes Q et T (intervalle QT) sur l'ECG, qui correspond à une augmentation de la durée du potentiel d'action ventriculaire (**Figure 17**). On parle de SQTL lorsque l'intervalle QT corrigé (QTc) est supérieur à 440 ms, selon la formule de Bazett (en ms):

$$QTc = \frac{\text{intervalle QT}}{\sqrt{\text{intervalle RR}}} \quad \text{où l'intervalle RR est exprimé en secondes.}$$

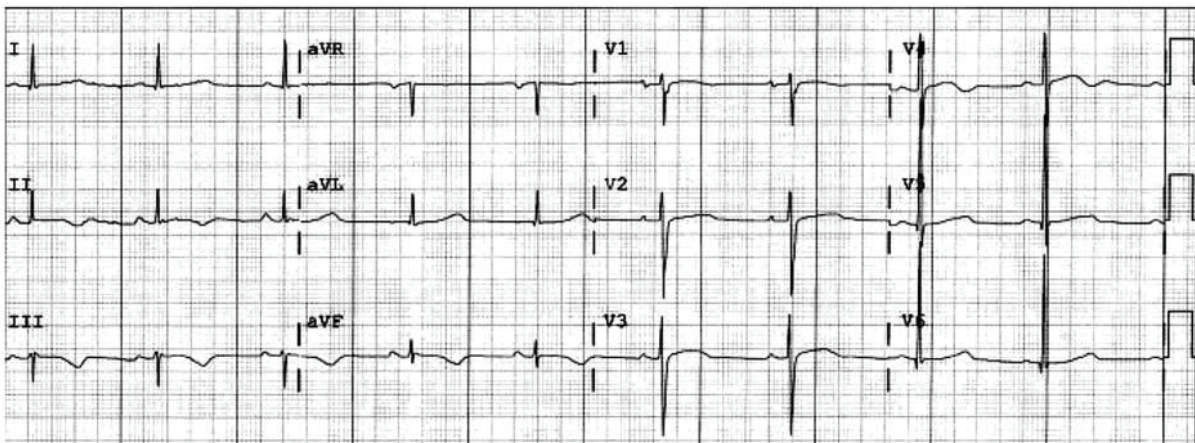


Figure 17 : ECG caractéristique d'un QT long.

Exemple d'ECG d'un patient présentant un syndrome du QT long. Figure extraite de Zareba and Cygankiewicz, 2008.

Ce syndrome peut prédisposer à la survenue d'activités électriques aberrantes (post-dépolarisations précoces ou retardées) ou même les provoquer (**Figure 18**). Celles-ci peuvent engendrer des torsades de pointes qui, lorsqu'elles évoluent en une fibrillation ventriculaire, peuvent causer une syncope parfois irréversible, à l'origine de cas de mort

subite. La prévalence du SQTL est estimée entre 1:3000 et 1:5000 dans la population générale (Zareba and Cygankiewicz, 2008).

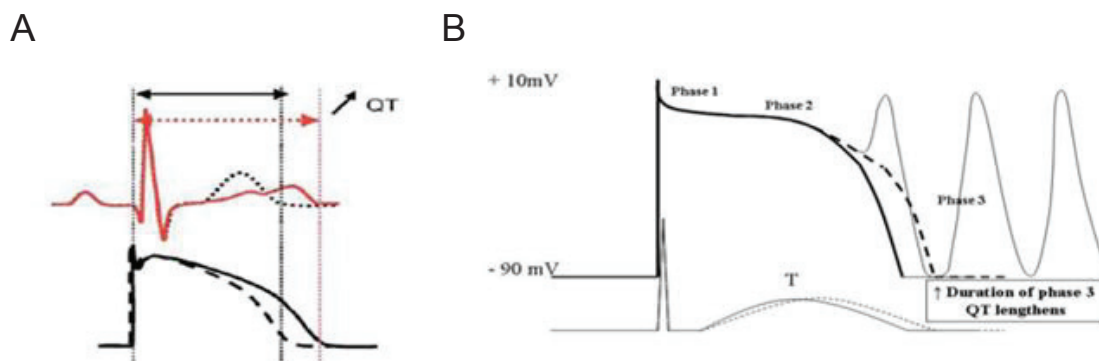


Figure 18 : Syndrome du QT long et post-dépolarisations.

A. Illustration présentant un allongement de l'intervalle QT dans le SQTL. **B** : Une augmentation de la durée de la phase de plateau du potentiel d'action peut entraîner la survenue d'arythmies ventriculaires (post-dépolarisations).

Le SQTL peut être soit congénital lorsqu'il est la conséquence de différentes mutations, soit acquis par l'activité de certaines molécules extrinsèques (Mitcheson et al., 2000a).

Le SQTL congénital, reconnu depuis plus de 50 ans, possède deux phénotypes cliniques distincts : le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen avec un QT long qui est associé à une surdité congénitale et celui de Romano-Ward (Jervell and Lange-Nielsen, 1957; Romano et al., 1963; Ward, 1964).

Il existe aujourd'hui 15 formes de SQTL congénital, classées en fonction du gène mis en cause (**Tableau 2**) (Mizusawa et al., 2014). Le plus souvent, ce sont des gènes qui codent pour des canaux ioniques ou pour d'autres protéines qui interagissent avec ces canaux. Certaines agissent sur l'homéostasie intracellulaire des ions calcium.

Des tests génétiques sont maintenant disponibles pour identifier la présence d'une mutation et peuvent aider directement au choix des thérapies. La cause la plus commune de SQTL d'origine génétique est la présence d'une mutation sur les gènes KCNQ1 (LQT1, ~50% des cas), KCNH2 (LQT2, ~40% des cas) ou SCN5A (LQT3, ~5% des cas).

Tableau 2 : Les différentes formes de syndrome du QT long congénital et leurs gènes associés

Formes	Gènes impliqués	Références
SQTL 1	Sous-unité alpha du canal potassique rectifiant retardé lent (KCNQ1)	(Wang et al., 1996)
SQTL 2	Sous-unité alpha du canal potassique rectifiant retardé rapide (KCNH2)	(Curran et al., 1995)
SQTL 3	Sous-unité alpha du canal sodique (SCN5A)	(Wang et al., 1995)
SQTL 4	Protéine d'ancrage des canaux, Ankyrine B (ANKB)	(Mohler et al., 2003)
SQTL 5	Sous-unité bêta MinK (KCNE1), qui s'assemble avec KCNQ1	(Schulze-Bahr et al., 1997)
SQTL 6	Sous-unité bêta MiRP1 (KCNE2), qui s'assemble avec hERG	(Abbott et al., 1999)
SQTL 7	Canal potassique codé par le gène KCNJ2 (Kir2.1)	(Plaster et al., 2001)
SQTL 8	Sous-unité alpha du canal calcique Cav1.2 codé par le gène CACNA1c	(Splawski et al., 2004)
SQTL 9	Composante du complexe dystrophine-cavéoline 3 codée par le gène CAV 3	(Vatta et al., 2006)
SQTL 10	Sous-unité bêta $\text{Na}_v\beta 4$ (SCN4B) du canal sodique	(Medeiros-Domingo et al., 2007)
SQTL 11	Protéine d'ancrage de la kinase A au KCNQ1 : AKAP9	(Chen et al., 2007)
SQTL 12	Protéine régulatrice de SCN5A : SNTA1	(Ueda et al., 2008)
SQTL 13	KCNJ5 : protéine Kir3.4	(Yang et al., 2010)
SQTL 14	CALM1 : Calmoduline 1 intervenant dans la signalisation calcique	(Crotti et al., 2013)
SQTL 15	CALM2 : Calmoduline 2 intervenant dans la signalisation calcique	(Crotti et al., 2013)

L'allongement de la phase de plateau du potentiel d'action peut favoriser la survenue d'arythmies cardiaques graves. Chez les patients diagnostiqués SQTL, il est important de prévenir le risque de survenue des arythmies. Le plus souvent, on prescrit aux patients des agents β -bloquants qui diminuent le risque de survenue d'arythmies lors de différents stress (exercice, émotion...) (Moss et al., 2000). On peut aussi supplémenter les patients en potassium en cas d'hypokaliémie. Il a été montré qu'une augmentation modérée de la concentration sanguine en potassium permet de corriger les anomalies de repolarisation dans le SQTL (Compton et al., 1996). Une concentration élevée en potassium extracellulaire raccourcit le potentiel d'action en stimulant les canaux hERG, dont la conductance est augmentée par le potassium extracellulaire (Guo et al., 2009). Dans le cas de patients à très haut risque ($QT_c > 500$ ms), on peut décider d'implanter un défibrillateur cardiovasculaire (Zareba et al., 2003).

2.2.2 Le syndrome du QT court

Plus récemment, il est apparu que, comme avec le QT long, un raccourcissement de l'intervalle QT pouvait aussi jouer un rôle très important dans la survenue d'arythmies et de morts subites. Une étude analysant les enregistrements Holter de 6693 patients a révélé que, paradoxalement, un raccourcissement (<400 ms), aussi bien qu'un allongement (>440 ms) de l'intervalle QT_c est associé, de façon similaire, à la survenue de morts subites (Algra et al., 1993).

Le syndrome du QT court (SQTC) est défini par un intervalle QT_c raccourci, inférieur à 320 ms sur l'électrocardiogramme (Viskin, 2009) et peut être accompagné ou non par des symptômes cliniques secondaires à des arythmies atriales ou ventriculaires.

Aujourd'hui, des mutations sur 5 gènes différents ont été associées au SQTC, et par conséquent, on dénombre aujourd'hui 5 formes de SQTC (**Tableau 3**). Le SQTC peut aussi être acquis par la prise de certaines molécules qui raccourcissent l'intervalle QT (Shah et al., 2010) ou bien par d'autres facteurs tels que l'acidose, l'hyperkaliémie, l'hypercalcémie, l'hyperthermie...

La prévalence d'un QT inférieur à 350 ms varie de 0,01 à 0,3% en fonction de la population étudiée (Moriya et al., 2007).

Tableau 3 : SQTC congénital et gènes associés

Formes	Gènes impliqués	Références
SQTC 1	Sous-unité alpha du canal potassique rectifiant retardé rapide (KCNH2)	(Brugada et al., 2004)
SQTC 2	Sous-unité alpha du canal potassique rectifiant retardé lent (KCNQ1)	(Bellocq et al., 2004)
SQTC 3	Canal potassique codé par le gène KCNJ2 (ou Kir2.1)	(Priori et al., 2005)
SQTC 4	Sous-unité du canal calcique de type L CACNB2b	(Antzelevitch et al., 2007)
SQTC 5	Sous-unité du canal calcique de type L CACNA1C	(Antzelevitch et al., 2007)

L'approche thérapeutique concernant les patients avec un SQTC inclut l'implantation d'un défibrillateur cardiovasculaire et une pharmacothérapie. L'implantation du défibrillateur cardiaque reste de loin la meilleure intervention pour prévenir des risques d'événements cardiaques (Schimpf et al., 2005).

2.2.3 La fibrillation atriale

La fibrillation atriale (FA) est l'arythmie cardiaque chronique la plus répandue. Elle fait partie des troubles du rythme supra-ventriculaires. Elle correspond à une désynchronisation électrique des cellules myocardiques auriculaires, ce qui aboutit à une contraction rapide et irrégulière des oreillettes cardiaques. La vidange du sang de l'oreillette vers le ventricule est alors moins efficace, le sang peut stagner dans l'oreillette et des caillots sanguins peuvent s'y former et augmenter les risques thromboemboliques.

La FA peut être qualifiée de paroxystique, lorsque l'épisode dure moins de 7 jours, en général moins de 48h, et se termine spontanément ; de persistante lorsqu'elle dure entre 1 semaine et 1 mois et se réduit de manière spontanée ou sous traitement ; ou de permanente quand elle dure plus d'un mois.

2.2.3.1 Épidémiologie

La FA a été décrite chez l'homme en 1906 par Arthur Cushny et Charles Edmunds (Cushny and Edmunds, 1906), et représente aujourd'hui un problème de santé publique majeur. En effet, on estime que 1 à 2% de la population générale est touchée par la FA sachant que sa prévalence augmente avec l'âge (<0,5% entre 40 et 50 ans ; de 5 à 15% à 80 ans). Plus de 6 millions d'européens souffrent de cette pathologie et sa prévalence devrait au moins doubler dans les 50 prochaines années du fait du vieillissement de la population (Go et al., 2001; Stewart et al., 2001).

La fibrillation atriale est associée à une augmentation du risque de décès, de crise cardiaque, d'insuffisance cardiaque et d'autres événements notamment thromboemboliques. Ainsi, la FA augmente de 5 fois le risque d'accident vasculaire cérébral et il est estimé qu'un sur cinq d'entre eux peut être attribué à cette arythmie. La FA entraîne une diminution des capacités physiques des patients et réduit leur qualité de vie. Bien qu'elle soit souvent associée à des symptômes bien précis comme des palpitations, des vertiges ou encore des syncopes, une grande proportion de patients est asymptomatique.

De très nombreux facteurs prédisposant à la FA entrent en jeu, tels que l'âge, l'hypertension, la bradycardie, l'insuffisance cardiaque, les cardiomyopathies, l'obésité, le diabète, les dysfonctions thyroïdiennes, l'apnée du sommeil... (**Figure 19**). Cependant, dans 10 à 15% des cas, aucune pathologie associée n'est diagnostiquée. On parle alors de fibrillation atriale isolée (Brand et al., 1985).

Il existe enfin des facteurs génétiques prédisposant à la fibrillation atriale qui peuvent se transmettre de génération en génération. Plusieurs mutations sur différents gènes ont été identifiées comme étant des facteurs indépendants de risque de fibrillation atriale (**Tableau 4**) (Benjamin et al., 2009; Body et al., 2009; Ellinor et al., 2010; Macri et al., 2014).

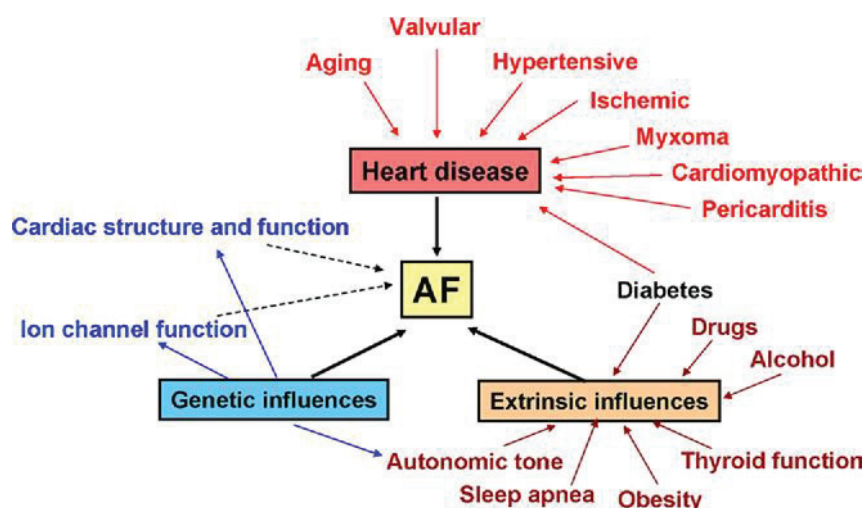


Figure 19 : Caractère multifactoriel de la FA.

Interrelations entre les différents facteurs qui gouvernent la survenue de la fibrillation atriale chez un individu. Figure extraite de Nattel, 2011.

Tableau 4 : Génétique et FA.

Genes	Chromosomes	Variants	Functional consequences
Inherited mutations			
KCNQ1	11p15	S140G, V141M	Gain-of-function effect on I_{Ks} currents
KCNE2	21q22	R27C	Gain-of-function effect on I_{Kr} currents
KCNJ2	17q23-q24	V93I	Gain-of-function effect on I_{K1} currents
KCNE3	11q13-q14	R53H	Unknown
KCNH2	7q35-q36	N588K	Gain-of-function effect on I_{Kr} currents
KCNE5	Xq22.3	L65F	Gain-of-function effect on I_{Ks}
KCNA5	12p13	E375X, T527M, A576V, E610K	Loss-of-function effect on I_{Kur} currents
ABCC9	12p12.1	T1547I	Retention of adenosine-triphosphate-induced inhibition of K^+ current
SCN5A	3p21	M1875T	Gain-of-function effect on I_{Na} currents
		D1275N, N1986K	Loss-of-function effect on I_{Na} currents
SCN1B	19q13.1	R85H, D153N	Loss-of-function effect on I_{Na} currents
SCN2B	11q23	R28Q, R28W	Loss-of-function effect on I_{Na} currents
GJA5	1q21.1	P88S, M163V, G38D, A96S	Dominant negative effect on gap junctions
NPPA	1p36-p35	c.456-457delAA	Shortened action potential duration and effective refractory period
RYR2	1q43	p.Asn57-Gly91	Defects in calcium ion handling
TBX5	12q24.1	p.Gly125Arg	Enhanced DNA binding and activation of both the NPPA (ANP) and Cx40 promoter
NUP155	5p13	R391H	Inhibition of the export of Hsp70 messenger RNA and nuclear import of Hsp70 protein
Somatic mutations			
GJA5	1q21.1	P88S, M163V, G38D, A96S	Dominant negative effect on gap junctions
GJA1	6q22-q23	c.932delC	Dominant negative effect on gap junctions

Liste non exhaustive des mutations ayant été rapportées comme causales pour la fibrillation atriale.
D'après Xiao et al., 2011.

2.2.3.2 Mécanismes de la FA

De nombreux dysfonctionnements cardiaques peuvent induire un remodelage structurel du muscle cardiaque. Au niveau de l'oreillette, une prolifération cellulaire, une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ou bien la mise en place d'une fibrose peuvent entraîner des hétérogénéités dans la conduction électrique, ce qui peut faciliter ou bien perpétuer la FA.

Le plus souvent, la fibrillation auriculaire est associée à une diminution de la durée du potentiel d'action atrial et de sa période réfractaire, période durant laquelle des potentiels d'action ne peuvent normalement pas être déclenchés (inactivation des canaux sodiques). L'impulsion électrique peut donc retourner sur des zones de conduction déjà activées par la même stimulation, et créer des circuits de réentrée.

L'existence de foyers ectopiques auriculaires a aussi été décrite comme un mode de genèse d'arythmies (**Figure 20**) (Nattel, 2002).

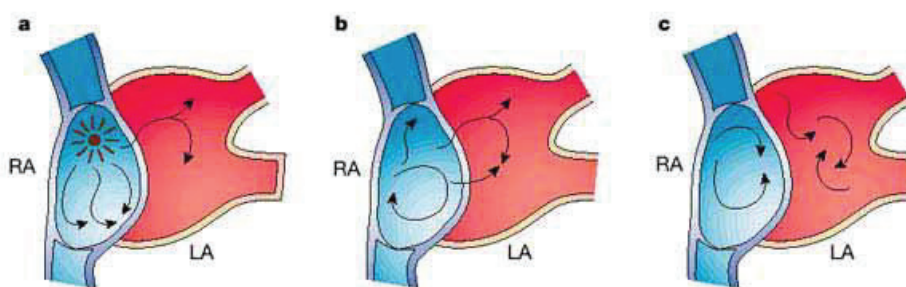


Figure 20 : Modèle conceptuel de la mise en place et du maintien de la fibrillation atriale.

En a, la FA est déclenchée par l'existence d'un foyer ectopique. En b, elle est générée par un circuit de réentrée. En c, la FA est maintenue par de multiples circuits de réentrée. Figure extraite de Nattel, 2002.

Le déclenchement du trouble du rythme est maintenant vu comme l'association de différents éléments déclencheurs (trigger) et d'un substrat favorable au maintien de l'arythmie. Le rôle des veines pulmonaires dans l'initiation de la fibrillation auriculaire est maintenant bien identifié. Elles peuvent être le site d'initiation (gâchette) d'une tachycardie atriale rapide favorisant la transition vers des circuits de réentrée (Haïssaguerre et al., 1998).

Une fois la FA établie, une série de changements des propriétés électriques et structurales du myocarde peut par la suite fournir un substrat qui peut maintenir l'arythmie. On dit que la FA entraîne la FA (Wijffels et al., 1995).

2.2.3.3 Traitement

Un pouls irrégulier doit toujours être une suspicion de FA, mais un enregistrement ECG est nécessaire pour la diagnostiquer.

Le traitement médical actuel de la FA repose sur des approches pharmacologiques ou non pharmacologiques qui visent à rétablir un rythme sinusal normal (cardioversion), et à réduire les risques de récurrence.

Les moyens thérapeutiques les plus utilisés sont les médicaments anti-arythmiques de type amiodarone ou flécaïnide, ou bien le choc électrique externe ou endocavitaire (défibrillateur).

En cas d'échec, ou bien lorsqu'un foyer ectopique ou un circuit de réentrée a été mis en évidence, on peut procéder à des techniques d'ablation. La plupart des fibrillations auriculaires proviennent de foyers d'activation situés à proximité de l'arrivée des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche : l'isolement électrique des veines pulmonaires par voie endocavitaire (ablation par radiofréquence) permet de diminuer très sensiblement le risque de récurrence par rapport au traitement anti-arythmique classique (Haïssaguerre et al., 1998).

Dans tous les cas, il faut prévenir des risques de complications thromboemboliques en prescrivant aux patients des anticoagulants.

3 Matériels et méthodes

3.1 Modèles d'expression utilisés

3.1.1 Ovocytes de Xénope

3.1.1.1 Justification du modèle

Les ovocytes de Xénope constituent un très bon modèle pour l'étude des canaux ioniques. La justification de leur utilisation en électrophysiologie ainsi que leur caractérisation ont été décrites très exhaustivement par Dascal (Dascal, 1987). Tout d'abord, ce sont de grosses entités (environ 1,3 mm de diamètre), ce qui facilite l'approche et la pénétration des électrodes pour le voltage-clamp. Leur grande taille permet aussi de pouvoir leur injecter relativement facilement diverses substances. Leur deuxième avantage est qu'ils ont la capacité de synthétiser des protéines exogènes en réponse à une injection d'ARNm. On peut ainsi leur faire exprimer les différents canaux ioniques que l'on veut caractériser.

3.1.1.2 Préparation des ovocytes

Une femelle *Xenopus laevis* est anesthésiée avec 1,5 mg/mL de tricaine (Sigma) et deux ou trois lobes ovariens sont prélevés par chirurgie. Les ovocytes sont ensuite défolliculés par une incubation de 2 heures à 20°C dans un milieu sans calcium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,6) contenant 2 mg/mL de collagénase (Sigma). Les ovocytes sont ensuite rincés et stockés dans une solution diluée de milieu de Leibovitz (Gibco) enrichie de 15 mM d'HEPES, 1 mM de L-glutamine et de 50 µg/mL de gentamicine (pH 7,6) à 18°C. Seuls les ovocytes de stades V et VI sont sélectionnés et injectés avec l'ARN messager.

3.1.1.3 Injection des ovocytes

Trois conditions sont réalisées : une première où les ovocytes sont injectés avec seulement de l'ARNm codant pour la protéine WT, une deuxième où l'on injecte de l'ARNm codant pour la protéine mutée et une troisième où les ovocytes sont injectés avec un

mélange des deux ARNm afin de reproduire la condition hétérozygote. Les expérimentations en voltage-clamp ont lieu 3 à 5 jours suivant l'injection (Chahine et al., 1992).

3.1.2 Cellules de mammifères

3.1.2.1 Cellules COS7

Les expérimentations en patch-clamp ont été réalisées principalement sur des cellules Cos-7. C'est une lignée cellulaire de type fibroblaste, dérivée de cellules du tissu rénal de singe vert (Gluzman, 1981). Elles ont la particularité d'être des cellules qui se cultivent assez facilement. Elles ne possèdent que très peu de courants ioniques endogènes et sont capables d'exprimer une fonction qui leur est apportée par transfection d'un plasmide qui contient un ou plusieurs gènes d'intérêts. De plus, ce sont des cellules de mammifères. Toutes ces caractéristiques en font un modèle d'étude très apprécié particulièrement en électrophysiologie.

3.1.2.2 Cellules TSA 201

Les cellules TSA201 sont une bonne alternative aux cellules Cos7. Elles dérivent des cellules HEK293 (human embryonic kidney) et expriment de façon stable l'antigène T SV40. Cette lignée est utilisée dans de nombreuses études fonctionnelles d'expression et est rapportée comme produisant une très grande quantité de protéine recombinante.

3.1.2.3 Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans un milieu composé de DMEM (Dubelcco's modified eagle medium, Eurobio) supplémenté de 5% de SVF (sérum de veau fœtal, Eurobio) et 1% d'un mélange de streptomycine et pénicilline. On peut monter jusqu'à 10% de SVF si l'on veut avoir une multiplication cellulaire plus rapide. Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂.

Tous les 3 ou 4 jours, les cellules sont repiquées. Pour ce faire, le milieu de culture est éliminé par aspiration, puis on procède à deux rinçages successifs au PBS 1X. Les cellules sont décollées avec un volume d'une solution de trypsine-EDTA (0,25% de trypsine-0,53 mM EDTA) dans du PBS. On laisse agir la trypsine quelques minutes en plaçant la flasque dans

l'étuve, tout en suivant régulièrement le décollement au microscope. Lorsque les cellules sont parfaitement décollées de la flasque, on ajoute immédiatement 5 volumes de milieu préchauffé dans la flasque pour stopper l'action de la trypsine. Le contenu de la flasque est ensuite centrifugé à 900 rpm pendant 4 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé puis on resuspend les cellules dans du milieu de culture avant l'ensemencement.

3.1.2.4 Transfection

Pour réaliser les transfections, on ensemence des boîtes de Pétri de 35 mm à raison de 100 000 cellules par boîte. Les cellules seront transfectées 3 jours plus tard, le temps qu'elles atteignent une confluence d'au moins 50%.

La méthode de transfection utilisée est la méthode au phosphate de calcium. Le principe est de favoriser la formation des cristaux de phosphate de calcium qui vont piéger plusieurs molécules de plasmides que l'on veut faire exprimer par les cellules. Ces cristaux sont internalisés par les cellules, qui peuvent ainsi transcrire puis traduire les plasmides en protéines.

Les plasmides utilisés contenant les gènes des canaux d'intérêt ont été construits par le personnel du laboratoire du Pr Mohamed CHAHINE (Québec).

Dans chaque condition de transfection, les cellules sont cotransfectées avec le plasmide pIRES-CD8. La molécule CD8 est un marqueur présent normalement à la surface de certains lymphocytes T. Cette molécule, qui est alors exprimée par les cellules, nous permet de localiser les cellules transfectées grâce à l'utilisation de billes magnétiques enrobées d'anticorps anti-CD8.

Pour la transfection, les plasmides des gènes d'intérêt sont mélangés dans 100 μ L d'une solution de CaCl_2 250 mM préalablement filtrée avec un filtre d'acétate de cellulose à 0,2 μ m puis stockée à -80°C . Ce mélange est ensuite déposé goutte à goutte dans 100 μ L d'une solution de HEBS 2x (en mM : 274 NaCl, 40 Hepes, 12 Dextrose, 10 KCl et 1,4 Na_2HPO_4 , pH=7,05 ajusté avec du NaOH, filtré à 0,2 μ m, et stocké à -80°C). Après un délai de 20 minutes, juste avant de déposer la solution obtenue goutte à goutte sur les cellules, on change le milieu de culture avec un milieu plus riche en SVF (10%).

Le lendemain, les cellules sont repiquées puis on ensemence de nouvelles boîtes de 35 mm dans lesquelles les expérimentations de patch-clamp auront lieu les trois jours suivants (j2 à j4 après la transfection).

3.1.2.5 Localisation des protéines canal par immunomarquage

Des cellules Cos-7 transfectées sontensemencées sur des lamelles de 20 mm de côté déposées au fond de boîtes de Pétri de 35 mm à raison de 400 000 cellules par boîte. Les cellules sont maintenues à l'étuve pendant 48 h. Chaque boîte est ensuite rincée 3 fois avec 1 mL d'une solution de PBS + 1 mM Ca^{2+} , avant de fixer les cellules dans une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes. Les lamelles sont à nouveau rincées avec 1 mL de PBS + 1 mM Ca^{2+} , puis immergées dans une solution de blocage (PBS + 1 mM Ca^{2+} , 0,1% triton X100, 0,1% BSA) pendant 20 minutes. Une goutte de 20 μL de dilution d'anticorps primaire est déposée sur un parafilm. La lamelle est retournée sur la goutte, la face portant les cellules vers le bas est alors au contact d'un film liquide d'épaisseur uniforme.

Après une nuit à 4°C, les lamelles sont rincées 3 fois 10 minutes dans un bain de solution de blocage, avant d'être mises en contact avec 20 μL d'un anticorps secondaire marqué par un fluorophore pendant 1 heure. Les lamelles sont ensuite rincées 4 fois 10 minutes dans un bain de solution de blocage puis 2 fois 5 minutes dans du PBS + 1 mM Ca^{2+} . On réalise une coloration au bromure d'éthidium afin d'identifier les noyaux des cellules, en plongeant les lamelles 10 minutes dans une solution concentrée à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les lamelles sont une dernière fois rincées 2 fois 5 minutes dans une solution de PBS + 1 mM Ca^{2+} puis montées sur une lame avec une goutte de milieu de montage (Fluoromount (Sigma)). Elles sont enfin lutées au moyen d'un vernis à ongles transparent.

Les lames sont maintenues à 4°C jusqu'à l'observation sur un microscope confocal à fluorescence (Leica SP5 X).

3.1.2.6 Quantification des protéines par Western Blot

Des boîtes de Petri de 35 mm sontensemencées par des cellules transfectées par le gène d'intérêt à 100 000 cellules. Deux jours plus tard, les cellules sont rincées au PBS puis lysées par 100 μL de tampon Ripa (en mM : 150 NaCl, 1,0% NP-40 ou Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 50 Tris, pH 8,0). La lyse se fait sur la glace pendant 30 minutes.

Les lysats sont soniqués puis dosés avant d'être utilisés pour les western-blots.

Les protéines sont d'abord dénaturées par un chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Puis la migration se fait en présence de SDS après dépôt de 20 μg de chaque échantillon dans les

puits d'un gel contenant 10% de polyacrylamide. Enfin, les protéines sont transférées sur une membrane.

Les membranes sont d'abord saturées avec une solution de TBS + 0,1% Tween + 5% de lait en poudre, avant d'être incubées avec les anticorps primaires (dilués selon les préconisations des fabricants) pendant toute une nuit à 4°C. En parallèle, on incube les membranes avec un anticorps de souris anti-tubuline dilué au 1/1000.

Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du TBS puis incubées avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois 10 minutes dans du TBS puis imbibées d'une solution d'ECL, avant d'être révélées au contact d'un film photographique.

3.2 Techniques électrophysiologiques

3.2.1 Mesures en voltage-clamp à double électrode

La technique de voltage-clamp en configuration cellule entière sur les ovocytes requiert l'utilisation de deux électrodes insérées dans l'ovocyte. La première microélectrode est utilisée pour mesurer la différence de potentiel avec l'électrode de référence, et la seconde sert à délivrer le courant afin de maintenir le potentiel à une valeur voulue (**Figure 21**).

Les électrodes sont étirées de façon à obtenir une résistance en série inférieure à 1 M Ω et sont remplies d'une solution contenant 3 M de KCl.

Le potentiel de membrane des ovocytes est imposé par un amplificateur Warner OC-725 (Warner Instrument Corp., Hamden, CT, USA) et les protocoles de voltage sont générés par le logiciel pCLAMP version 9 (Axon Instruments).

Les enregistrements électrophysiologiques se font à température ambiante (20°C) sur des ovocytes maintenus dans une petite chambre perfusée par une solution de Ringer (en mM : 116 NaCl, 2 KCl, 1,8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7,6 avec NaOH)). Les données sont analysées par le logiciel ClampFit 8 et grâce à des programmes écrits au laboratoire dans l'environnement MATLAB.

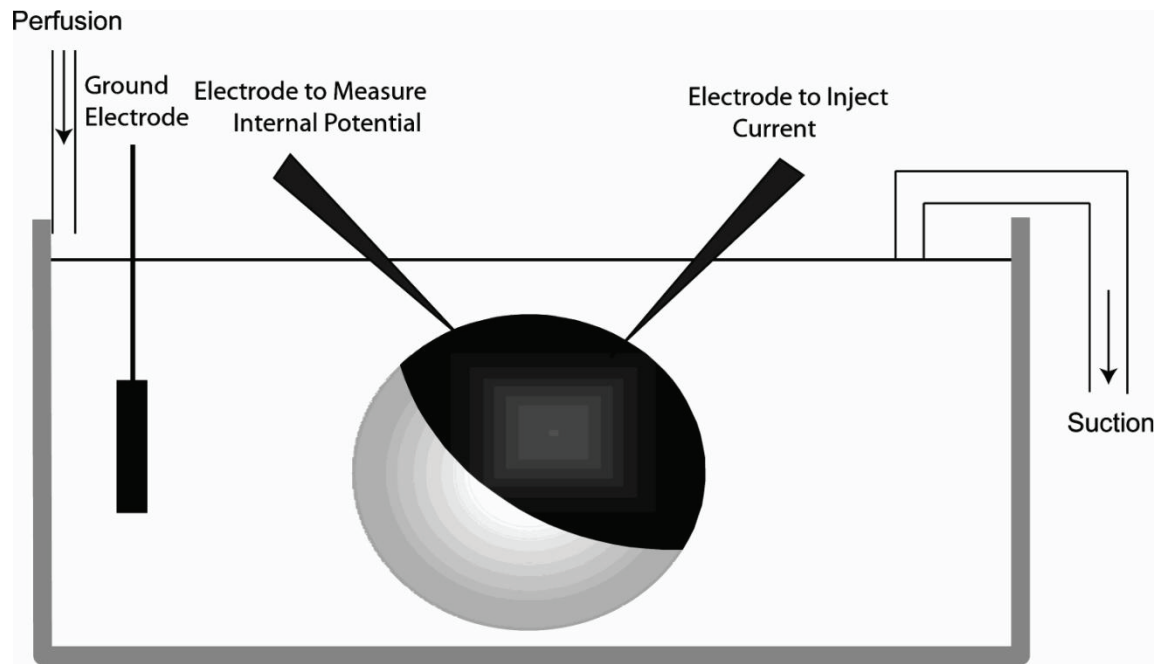


Figure 21 : Mesure en voltage-clamp à double microélectrodes.

Un ovocyte de Xénope est placé dans une chambre perfusée puis deux électrodes sont délicatement insérées à travers la membrane grâce à des micromanipulateurs. La première électrode mesure le potentiel interne de l'ovocyte alors que la deuxième est utilisée pour délivrer le courant afin de maintenir un certain potentiel. Figure extraite de Goldin, 2006.

3.2.2 Mesures en patch-clamp

Les expérimentations sur les cellules Cos-7 en culture se font en voltage-clamp en configuration de cellule entière. Cette configuration permet d'enregistrer l'ensemble des courants de la cellule.

Cette technique consiste à mettre en continuité électrique une micropipette de verre (environ 2 - 3 MΩ de résistance interne) remplie d'une solution ionique de composition définie, avec l'intérieur d'une cellule vivante (**Figure 22**). La différence de potentiel électrique entre l'intérieur (micropipette) et l'extérieur de la cellule (électrode de référence) est mesurée en continu et maintenue à une valeur souhaitée en injectant un courant électrique, via la micropipette, qui s'oppose au courant qui traverse les canaux ioniques (déplacement des ions).

Le principe repose sur l'utilisation de la loi d'Ohm $U=R \cdot I$, où U est la tension, R la résistance et I le courant. En mode *voltage-clamp*, la tension est maintenue constante et le

courant I est mesuré. Les modifications de I dépendent directement de la conductance ($G=1/R$), qui dérive des propriétés du canal. En mode *current-clamp*, on mesure le potentiel membranaire en imposant un courant continu.

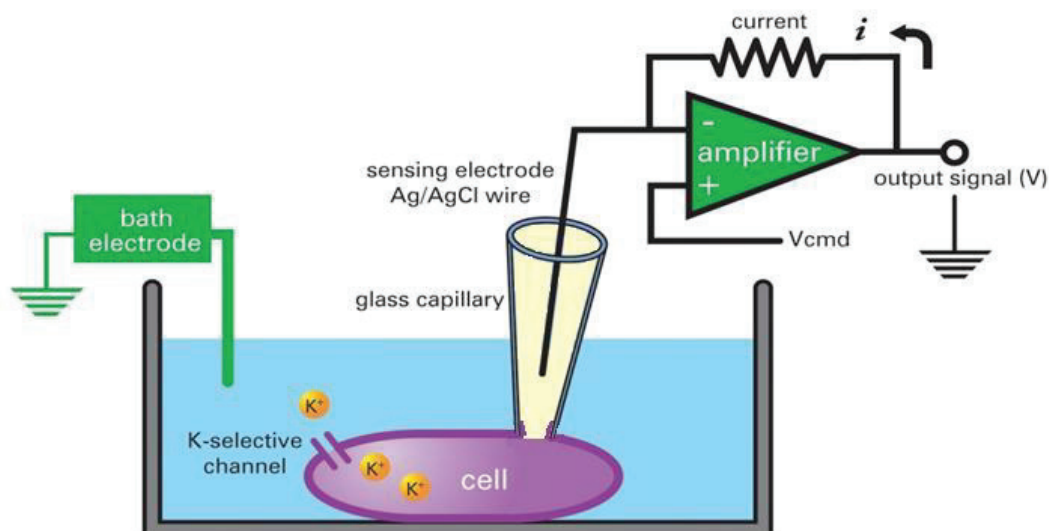


Figure 22 : Patch-clamp en configuration cellule entière.

Une électrode (pipette de verre) est amenée au contact de la membrane plasmique de la cellule. Une légère aspiration à travers la pipette va permettre de « casser » le morceau de membrane sous l'électrode, ce qui met en continuité l'intérieur de la pipette avec le cytoplasme. La même électrode sert à mesurer le voltage et à injecter le courant nécessaire pour maintenir le voltage à une valeur imposée.

On dispose d'un amplificateur de patch-clamp (BioLogic RK300, Biologic, Meylan, France) connecté via un convertisseur analogique-digital et digital-analogique (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, California) à un ordinateur PC fonctionnant sous Windows 3.11.

Les mesures sont faites sur des cellules dont le milieu de culture est remplacé par une solution de Tyrode (en mM : 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 1CaCl₂ et 10 HEPES, pH 7,4 ajusté avec NaOH).

Les électrodes utilisées sont fabriquées en étirant un capillaire de verre de 1,5 mm de diamètre externe grâce à une étireuse verticale (List Medical, L/M-3P-A). On réalise un double étirement reproductible de façon à obtenir des électrodes avec une résistance interne comprise entre 2 et 3 MΩ. Les électrodes sont remplies avec une solution de pipette dont la composition peut varier en fonction des expérimentations.

Différents protocoles standards de voltage sont appliqués sur les cellules, en fonction des caractéristiques du courant ionique que l'on cherche à étudier, grâce au logiciel CLAMPEX (version 6.04, Axon Instruments). Toutes les expérimentations sont réalisées à température ambiante (22°C). Les tracés obtenus sont exploités au moyen du logiciel Clampfit (version 6.04, Axon Instruments), de différentes routines programmées sous le logiciel MATLAB, (voir 3.2.1.3) et du logiciel Origin 7. (OriginLab Corp., Northampton MA USA).

3.2.3 Analyse mathématique des courants

Les analyses sont pour la plupart réalisées au moyen de routines écrites au laboratoire sous l'environnement MATLAB (The MathWorks Inc.). Les enregistrements en réponse à un protocole donné sont lus à partir des fichiers binaires *.abf créés par le logiciel PClamp au moyen de la fonction abfload.m écrite et mise à disposition par Harald Hentschke (2004).

Les mesures simples à un temps donné ainsi que l'évaluation des décours d'activation, de désactivation et d'inactivation dans des fenêtres de temps prédéfinies sont programmées pour permettre une analyse semi-automatique d'un grand nombre de fichiers de données de plusieurs séries expérimentales. De même l'analyse des résultats de ces mesures (courbes courant-voltage, courbes d'activation etc...) est programmée. Cette automatisation des mesures et analyses garantit une absence de biais lié à l'utilisateur et permet de répéter les analyses d'un grand nombre de tracés en un temps minimal lorsque les conditions de l'analyse sont modifiées.

Les cinétiques de variation temporelle des courants sont évaluées par ajustement de fonctions multi exponentielles. Les caractéristiques des courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable sont évaluées par ajustement d'une fonction de Boltzmann éventuellement élevée au carré ou au cube. Ces ajustements de fonctions se font au moyen des routines appropriées disponibles sous MATLAB, utilisant l'algorithme d'optimisation de Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1969).

Les résultats (mesures individuelles, moyennes, sd, SEM, n) sont produits sous forme de tableaux directement utilisables sous un logiciel tableur comme Origin v7 que nous utilisons pour la mise en forme des figures finales.

Les équations et formules utilisées pour l'analyse des données sont décrites dans chacun des manuscrits et publications fournis en annexe.

4 Résultats

4.1 La mutation Q1476R du gène SCN5A entraîne une surcharge sodique due à une augmentation du courant persistant

Article : **Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation**

Adrien Moreau, Andrew D. Krahn, Pascal Gosselin-Badaroudine, George J. Klein, Georges Christé, Yohann Vincent, Mohamed Boutjdir, Mohamed Chahine

Article publié dans *Frontiers in Pharmacology* (2013)

4.1.1 Introduction

Ce travail a été réalisé afin d'étudier l'effet de la mutation Q1476R, remplacement d'un résidu glutamine par un résidu arginine à la position 1476, localisée sur le gène SCN5A codant pour le canal sodique Na_v1.5. Cette mutation a été identifiée chez une femme de 34 ans atteinte d'un syndrome du QT long. Plusieurs membres de la famille de la patiente présentent aussi un phénotype de SQTl (Figure 1 de Moreau et al., 2013).

L'exploration biophysique de ce mutant a été réalisée par la technique du patch-clamp en l'exprimant dans une lignée de cellules de mammifères, les cellules tsA201. Les effets caractérisés *in vitro* ont été introduits dans un modèle mathématique de myocyte ventriculaire humain (Tusscher et al., 2004) afin de caractériser les effets de cette mutation sur la cinétique du potentiel d'action.

4.1.2 Résultats et discussion

Le résidu Q1476 est un acide aminé hautement conservé entre tous les canaux sodiques. Il est localisé dans la séquence nucléotidique de la porte d'inactivation du canal.

L'étude en patch-clamp a révélé un décalage positif de 6,5 mV de la courbe d'inactivation à l'état stable qui a pour conséquence directe d'augmenter le courant de fenêtre de 3 fois (Figures 3 et 5 de Moreau et al., 2013). De plus, cette mutation est responsable d'une

augmentation de la fraction persistante du courant sodique qui passe de $0,36 \pm 0,08\%$ du courant au pic pour le WT contre $0,74 \pm 0,11\%$, pour le mutant.

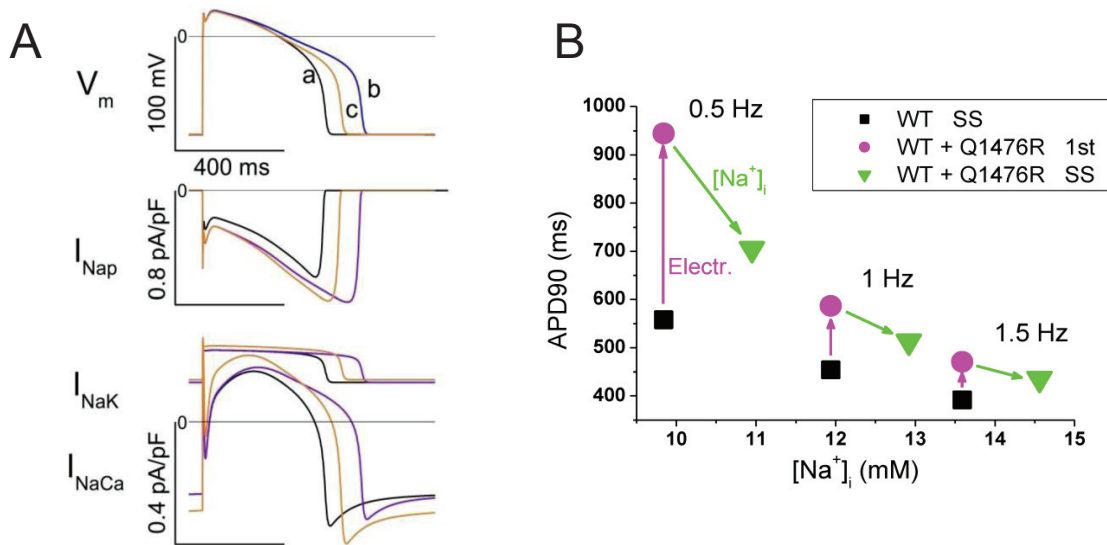


Figure 23 : Modélisation de l'effet de la mutation Q1476R du gène SCN5A sur le potentiel d'action.

A. Depuis l'état stable à 1 Hz dans le modèle WT (a), le modèle a été changé pour le modèle muté hétérozygote WR et le prochain potentiel d'action enregistré (b). Sous stimulation maintenue à 1 Hz, la durée du PA s'est ensuite raccourcie (c, enregistré à l'état stable). **B.** Les effets sur la durée du PA mesurée à 0,5, 1 et 1,5 Hz sont résumés dans le panneau de droite. L'effet électrique direct apparaît grandement atténué par l'élévation de $[Na^+]_i$ liée à l'activité, spécialement aux fréquences basses.

La modélisation des effets de cette mutation (**Figure 23** et Figures 7 et 8 de Moreau et al., 2013) a montré dans un premier temps que la mutation induisait immédiatement une augmentation de la durée des potentiels d'action (APD90 = 587 ms (trace b) pour le mutant contre 454 ms pour le WT (trace a)). Cependant, lorsqu'on laisse le modèle atteindre l'état d'équilibre, l'augmentation du courant persistant induit par la mutation entraîne peu à peu une augmentation de la concentration intracellulaire en sodium (12,92 mmol/L vs 11,94 mmol/L en WT). Cette surcharge sodique active alors la pompe Na/K ATPase mais surtout l'échangeur Na-Ca qui vont avoir tendance à raccourcir la durée du potentiel d'action et donc à modérer l'effet d'allongement du QT de la mutation (APD90 = 513 ms). Néanmoins, cette surcharge va entraîner une augmentation de la concentration intracellulaire calcique et prédisposer à des post-dépolarisations liées à la surcharge du réticulum sarcoplasmique.

Cependant, lorsque le modèle simule une bradycardie (0,5 Hz), la durée du potentiel d'action reste très élevée même à l'état stable. Lors d'une tachycardie modérée (1,5 Hz),

l'effet lié à la surcharge modérée en sodium intracellulaire va limiter l'effet direct d'allongement du potentiel d'action causé par le gain de courant dépolarisant.

4.1.3 Conclusion

Cette étude a montré que les effets biophysiques de la mutation Q1476R (augmentation du courant de fenêtre et du courant persistant) peuvent exposer les porteurs à des arythmies survenant préférentiellement durant le repos. Toutefois, la surcharge sodique entraînée par la mutation va modérer l'effet direct du gain de fonction et ainsi prévenir la survenue d'arythmies sévères pour des fréquences cardiaques lentes et intermédiaires. Cependant la surcharge en Na^+ peut aggraver l'effet de la mutation en conditions de tachycardie.

4.1.4 Publication



Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation

Adrien Moreau¹, Andrew D. Krahn², Pascal Gosselin-Badaroudine¹, George J. Klein³, Georges Christé⁴, Yohann Vincent⁴, Mohamed Boutjdir⁵ and Mohamed Chahine^{1*}

¹ Centre de Recherche de l'Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec, Québec City, QC, Canada

² Division of Cardiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

³ Division of Cardiology, University of Western Ontario, London, ON, Canada

⁴ Laboratoire de Neurocardiologie, Université Lyon, Lyon, France

⁵ VA New York Harbor Healthcare System, SUNY Downstate Medical Center and NYU School of Medicine, New York City, NY, USA

Edited by:

Hugues Abriel, University of Bern, Switzerland

Reviewed by:

Arie O. Verkerk, Academisch

Medisch Centrum Universiteit van Amsterdam, Netherlands

Said Bendahhou, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Lars S. Maier,

Georg-August-Universität, Germany

*Correspondence:

Mohamed Chahine, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec, 2601 Chemin de la Canardière, Québec City, QC G1J 2G3, Canada
e-mail: mohamed.chahine@phc.ulaval.ca

Long QT syndrome (LQTS) is a congenital abnormality of cardiac repolarization that manifests as a prolonged QT interval on 12-lead electrocardiograms (ECGs). The syndrome may lead to syncope and sudden death from ventricular tachyarrhythmias known as *torsades de pointes*. An increased persistent Na^+ current is known to cause a Ca^{2+} overload in case of ischemia for example. Such increased Na^+ persistent current is also usually associated to the LQT3 syndrome. The purpose of this study was to investigate the pathological consequences of a novel mutation in a family affected by LQTS. The impact of biophysical defects on cellular homeostasis are also investigated. Genomic DNA was extracted from blood samples, and a combination of PCR and DNA sequencing of several LQTS-linked genes was used to identify mutations. The mutation was reproduced *in vitro* and was characterized using the patch clamp technique and *in silico* quantitative analysis. A novel mutation (Q1476R) was identified on the *SCN5A* gene encoding the cardiac Na^+ channel. Cells expressing the Q1476R mutation exhibited biophysical alterations, including a shift of SS inactivation and a significant increase in the persistent Na^+ current. The *in silico* analysis confirmed the arrhythmogenic character of the Q1476R mutation. It further revealed that the increase in persistent Na^+ current causes a frequency-dependent Na^+ overload in cardiomyocytes co-expressing WT and mutant $\text{Na}_v1.5$ channels that, in turn, exerts a moderating effect on the lengthening of the action potential (AP) duration caused by the mutation. The Q1476R mutation in *SCN5A* results in a three-fold increase in the window current and a persistent inward Na^+ current. These biophysical defects may expose the carrier of the mutation to arrhythmias that occur preferentially in the patient at rest or during tachycardia. However, the Na^+ overload counterbalances the gain-of-function of the mutation and is beneficial in that it prevents severe arrhythmias at intermediate heart rates.

Keywords: cardiac arrhythmia, electrophysiology, $\text{Na}_v1.5$, long QT syndrome, LQT3, sodium overload, heart

INTRODUCTION

In cardiomyocytes, action potentials (AP) ensure the propagation of excitation and the triggering of contraction. AP characteristics are directly related to the activity of voltage-gated sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), and potassium (K^+) channels (Amin et al., 2010). After a slight depolarization, voltage-gated Na^+ channels ($\text{Na}_v1.5$), encoded by the *SCN5A* gene, activate, which leads to an inward Na^+ flow followed by a fast depolarization (Gellens et al., 1992). The AP is composed of a maintained depolarization, the “plateau” phase, followed by a final repolarization. The depolarization at the plateau is supported by a slowly decaying inward calcium current, background inward currents, and a persistent sodium current. The plateau is also supported by a delay in the onset of repolarizing potassium currents. The late activation of these potassium currents ensures final repolarization and causes

the membrane potential to return to the diastolic level after about 400 ms. The maintenance of action potential duration (APD) is critically related to the balance between depolarizing currents and repolarizing currents, so that an increase in depolarizing current(s) or a decrease in repolarizing current(s) will increase APD and, consequently, the QT interval of the electrocardiogram (ECG).

Long QT syndrome (LQTS) includes a congenital abnormality of cardiac repolarization that causes syncope and sudden death (Huang et al., 2011). This hereditary cardiac disease manifests as an increase in the QTc value over 450 ms on 12-lead ECGs, which points to an increase in the duration of ventricular APs. Under optimal conditions, QTc prolongation can induce ventricular tachyarrhythmia called *torsade de pointes* (TdP), which can degenerate into lethal ventricular fibrillation.

To date, mutations in thirteen genes have been identified as causing 13 types of LQTS (LQT1-13) (Schwartz et al., 2012) and are divided into three major groups: (1) mutations in genes encoding voltage-gated channels [*KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2), *SCN5A* (LQT3), *KCNJ2* (LQT7), *KCNJ5* (LQT13)], (2) mutations in genes encoding subunits regulating voltage-gated channel [*KCNE1* (LQT5), *KCNE2* (LQT6), *SCN4B* (LQT 10)], and (3) mutations in genes encoding channel interacting proteins [*ANKB* (LQT4), *KCNE1* (LQT5), *KCNE2* (LQT6), *CAV3* (LQT9)].

SCN5A gene mutations can lead to several inherited cardiac diseases such as LQT3, Brugada syndrome (BrS) (Moreau et al., 2012), progressive cardiac conduction defect (CCD), sinus node disease, and dilated cardiomyopathy (DCM) (Amin et al., 2010; Gosselin-Badaroudine et al., 2012). In LQT3, a gain-of-function mediated by the appearance of a persistent current usually characterizes Na^+ channel mutations. The persistent Na^+ current has previously been shown to induce Ca^{2+} overload (Tang et al., 2012). Indeed, in hypoxia condition, the persistent Na^+ current is increased and have been identified as a predominant cause of the deleterious Ca^{2+} overload (Tang et al., 2012). Such phenomenon could be important in the development of LQT3 syndrome and would be driven by the activation of Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. These exchangers are predominantly implicated in the Ca^{2+} , Na^+ , and pH regulation. However, most mutations in K^+ channels or their regulatory subunits cause a loss-of-function characterized by a dominant negative effect. These biophysical defects lead to AP prolongation, creating a substrate for the development of ventricular arrhythmias (Schwartz et al., 2012).

The purpose of our study was to investigate the impact of a mutation causing LQTS in a patient and her family members using an *in vitro* heterologous expression system, the voltage-clamp technique, and *in silico* analysis. The biophysical investigation of the mutation in tsA201 cells revealed a positive shift in steady-state (SS) inactivation that results in an increased window current associated with the presence of a persistent Na^+ current, which would explain the link between the mutation and LQTS in the family members. Furthermore, *in silico* experiments revealed that the persistent Na^+ current induces an increase in the intracellular Na^+ concentration. This causes an increase in repolarizing currents that shortens APD, counterbalancing the direct effect of the gain-of-function caused by the mutation and potentially benefitting the patient.

METHODS

CLINICAL EVALUATION

The proband and her family members underwent a detailed clinical and cardiovascular examination, including a 12-lead ECG, a determination of hemodynamic parameters, and laboratory blood tests. Echocardiography was used to exclude any structural heart disease. The QT interval was measured in lead II or V5 of the ECG and was corrected for the heart rate (QTc) using Bazett's formula. Exercise testing was performed to detect QT adaptation to heart rate changes, which is known to predict the genotype and direct therapy in LQTS (Schwartz et al., 2001; Wong et al., 2010).

The investigation conformed to the principles set out in the Declaration of Helsinki and was approved by the local institutional ethics committees on human subject research. The participants provided written informed consent prior to the study.

GENOTYPING

The samples were sent to Genaissance Familion® (New Haven, CT, USA) for genetic testing of inherited cardiac syndromes. Genomic DNA was extracted and was amplified by PCR. Templates of the target exons, splice junctions, and flanking regions of *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2), *SCN5A* (LQT3), *KCNE1* (LQT5), *KCNE2* (LQT6), *CACNA1C* (LQT8, exons 8 and 9), *CAV3* (LQT 9), *SCN4B* (LQT 10), *AKAP9* (LQT 11, exon 18), and *SNT12* (LQT 12) were generated and genotyped.

MUTAGENESIS

Mutant $\text{Na}_v1.5/\text{Q1476R}$ was generated using QuickChange TM site-directed mutagenesis kits according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The $\text{hNa}_v1.5/\text{mutants}$ were constructed from WT channels (NCBI accession number: M77235) using the following mutagenic sense and antisense primers (mutated sites are underlined):

1. 5'-CAACTTCAACCAACGGAAGAAAAAGTTAGGG-3'
2. 5'-CCCTAACTTTTTCTTCCGTTGGTTGAAGTTG-3'

Mutant and the wild-type (WT) $\text{Na}_v1.5$ in a pcDNA3 construct were purified using Qiagen columns (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

TRANSFECTION OF THE tsA201 CELL LINE

TsA201 is a mammalian cell line derived from human embryonic kidney HEK 293 cells by stable transfection with SV40 large T antigen (Margolskee et al., 1993). The tsA201 cells were grown in high glucose DMEM supplemented with fetal bovine serum (10%), L-glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (10 mg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and were incubated in a 5% CO_2 humidified atmosphere. The cells were transfected using the calcium phosphate method (Margolskee et al., 1993), with the following modification to facilitate the identification of individual transfected cells: the cells were co-transfected with an expression plasmid for a lymphocyte surface antigen (CD8-a) (Jurman et al., 1994). The human Na^+ channel β_1 subunit and CD8 were constructed in the piRES vector (piRES/CD8/ β_1). With this strategy, transfected cells that bind beads also express the β_1 -subunit. cDNA (5 μg) coding for the WT or mutant Na^+ channel α -subunit and 5 μg of piRES/CD8/ β_1 were used. For the patch clamp experiments, 2 to 3-day-post-transfection cells were incubated for 5 min in a medium containing anti-CD8-a coated beads (Jurman et al., 1994) (Dynabeads M-450 CD8-a). Unattached beads were removed by washing. The beads were prepared according to the manufacturer's instructions (DynaL A.S., Oslo, Norway). Cells expressing surface CD8-a fixed the beads and were visually distinguishable from non-transfected cells by light microscopy.

PATCH CLAMP TECHNIQUE

Macroscopic Na^+ currents from tsA201-transfected cells were recorded using the whole-cell configuration of the patch clamp technique (Hamill et al., 1981). Patch electrodes were made from 8161 Corning borosilicate glass and were coated with HIPEC (Dow-Corning, Midland, MI, USA) to minimize their capacitance. Patch-clamp recordings were made using low resistance electrodes ($<1\text{ M}\Omega$), and a routine series resistance compensation by an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) was performed to values $>80\%$ to minimize voltage-clamp errors. Voltage-clamp command pulses were generated by microcomputer using pCLAMP software v10.0 (Axon Instruments). Na^+ currents were filtered at 5 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a microcomputer equipped with an AD converter (Digidata 1300, Axon Instruments).

SOLUTIONS AND REAGENTS

For whole cell recordings, the patch pipette contained (in mmol/L): 35 NaCl, 105 CsF, 10 EGTA, and 10 Cs-HEPES. The pH was adjusted to 7.4 using 1 N CsOH. The bath solution contained (in mmol/L) 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, and 10 Na-HEPES. The pH was adjusted to 7.4 with 1 N NaOH. The recordings were made 5 min after establishing the whole cell configuration to allow the current to stabilize and to permit adequate diffusion of the contents of the patch electrode. All the recordings were made in the following order: I/V curve, SS inactivation, and recovery from inactivation. Experiments were carried out at room temperature ($22\text{--}23^\circ\text{C}$).

In silico analysis and AP modeling

The Priebe and Beuckelmann (1998) (PB), the Iyer et al. (2004) (IMW) model and the Ten Tusscher et al. (2004) (TNNP) models were considered as possible alternatives to represent human ventricular myocyte (Priebe and Beuckelmann, 1998; Iyer et al., 2004; Ten Tusscher et al., 2004). A comparison of these models was done by Ten Tusscher et al. in 2006 and it showed that the TNNP model was the most pertinent to reproduce the effects of IKr and IKs block on the human ventricular AP duration (Ten Tusscher et al., 2006). We considered it as a valid model to address changes related to LQT conditions. Besides, rather than using Markov models, this model is based on Hodgkin–Huxley equations, which are easy to adjust to known experimental data (Fink and Noble, 2009).

Thus, the *in silico* analysis was performed with the Ten Tusscher et al. (2004) model (Ten Tusscher et al., 2004), using the `tentusscher_noble_noble_panfilov_2004_a.cellml` file, ran in the COR environment (Peter Garny, <http://cor.physiol.ox.ac.uk/>).

Changes from the original set of equations are described in the Appendix.

When we attempted to modify the activation and inactivation parameters of the Na^+ current (INa) in the original TNNP model, instabilities were found, which could not be resolved. Thus, the mathematical equations used for activation, inactivation, and recovery from inactivation of INa were taken from a stable guinea-pig ventricular cell model adjusted for 37°C (Pasek et al., 2008). However, the processes were accelerated two-fold (the time constants were reduced two-fold). This was done to

allow the model to reproduce the experimentally observed Na^+ currents when we ran, in the model set for room temperature, the same voltage-clamp protocols as used in our *in vitro* experiments.

To adapt to the formalism of the Na^+ current (INa) calculation that uses m^3 , the measured values of the SS apparent activation variable measured in tsA201 cells were fitted with the following equation: $m_{\text{inf}} = [1/(1 + \exp((V_m - V_h)/k))]^3$, which yielded values of $V_h = -59.1\text{ mV}$ and $k = -7.9\text{ mV}$ for WT and $V_h = -56.8\text{ mV}$ and $k = -8.7\text{ mV}$ for Q1476R. This explains why these values of V_h and k were different from those calculated by fitting a simple Boltzmann function to data measured in tsA201 cells (Table 1).

Lastly, 5.5 mV was added to V_h and 0.5 mV to k to account for the difference in temperature given that the experiment was conducted at room temperature whereas the model was designed to work at 33°C , such that $V_h = -59.1 + 5.5$ and $k = -7.9 + 0.5$ for WT and $V_h = -56.8 + 5.5$ and $k = -8.7 + 0.5$ for Q1476R.

The SS inactivation functions were $h_{\text{inf}} = 1/(1 + \exp((V_m - V_h)/k))$, where $V_h = -92.0 + 5.5$ and $k = 4.4$ for WT, and $V_h = -86.1 + 5.5$ and $k = 4.3$ for Q1476R. In addition, 5.5 mV was added to V_h to account for the difference in temperature.

This adjustment of the kinetic parameters was derived from the detailed analysis of the effects of temperature on the activation and inactivation kinetics of $\text{Na}_v1.5$ channels by Nagatomo et al. (1998). It reflects a change in temperature from 23 to 33°C . A linear extrapolation to 37°C could have been done. Nevertheless, no differences should be observed as these corrections would apply to both WT and mutated fast INa model equations.

The modeling of the heterozygous condition is based on the assumption that, in the carrier, both the WT and the mutated genes would lead to the presence of equal amounts of each corresponding channel protein. Thus, half of the fast Na^+ current is characterized by the parameters of the WT channels while the second half is characterized by the parameters of the Q1476R channels.

The persistent part of the fast Na^+ current was initially absent in the TNNP model. A persistent current was added that would not inactivate but that would activate and deactivate following

Table 1 | Biophysical properties of $\text{Na}_v1.5/\text{WT}$ and Q1476R.

		WT (n = 13)	Q1476R (n = 14)
Peak current (pA/pF)		-739.1 ± 73.1	-690.8 ± 69.9
Persistent current (% I Na^+)		0.36 ± 0.08	$0.74 \pm 0.11^*$
Activation	$V_{1/2}$ (mV)	-47.9 ± 1.2	-46.3 ± 1.1
	k (mV)	-5.6 ± 1.2	-6.5 ± 0.4
Inactivation	$V_{1/2}$ (mV)	-92.0 ± 1.3	$-85.5 \pm 0.4^*$
	k (mV)	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Recovery from fast inactivation	A	99.9 ± 0.05	98.7 ± 1.1
	Tau	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.3

$V_{1/2}$, Mid-point for activation or inactivation.

k , Slope factor for activation or inactivation.

*Difference between $\text{Na}_v1.5/\text{WT}$ and $\text{Na}_v1.5/\text{Q1476R}$ ($p < 0.05$).

the same equations as the fast Na^+ current (see equations in the Appendix).

Initially, the model was run with the basic set of values of variables and constants as used in the TNNP 2004a model, except for the formulation of I_{Na} , as described above. The APD_{90} was measured as the time between upstroke and 90% repolarization from the highest level of the plateau. No attempt was made to readjust the APD_{90} at SS at 1 Hz, which was increased from 322 ms in the original TNNP model to 454 ms for our WT settings.

Voltage-clamp testing was performed using MATLAB to show that the basic properties of the fast I_{Na} current, the persistent Na^+ current and the window current, adjusted for room temperature, matched those of the WT and mutated currents as determined in the expression experiments when using the same protocols and measurement procedures in the presence of a realistic series resistance (not shown).

Based on our previous modeling experience with a persistent I_{Na} (Christe et al., 2008), it was necessary to allow the model to stabilize with a small amount of persistent I_{Na} before increasing the persistent I_{Na} until reaching at most one-third of the fraction of the fast peak I_{Na} observed in expression experiments. This was the maximal amount of persistent I_{Na} tolerated by the heterozygous mutation model in order to ensure that a stable AP was generated at 1 and 1.5 Hz.

DATA ANALYSIS AND STATISTICS

The electrophysiological data were analyzed using macros in Clampfit (pCLAMP v10.0, Molecular Devices) and custom programs written using MATLAB (The MathWorks Inc.). Data are expressed as means $\pm$ sem (standard error of the mean). Statistical comparison were performed using an unpaired Student's *t*-test or One-Way Anova with Bonferroni *post-hoc* test in Sigma plot (Jandel Scientific software). Differences were deemed significant at a *P*-value < 0.05 .

RESULTS

CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE INDEX PATIENT AND THE FAMILY MEMBERS

A 34-year-old female was assessed, in the context of a family history of sudden death, for a remote history of syncope after awakening to answer the telephone. Her sister had experienced a series of similar episodes at age 14 and had subsequently collapsed at rest and could not be resuscitated. The autopsy did not reveal a cause of death. A maternal cousin and grandaunt also experienced sudden death (Figure 1A). The resting QTc of the proband ranged from 450 to 485 ms and shortened to 422 ms at peak exercise. The echocardiogram was normal. Nadolol 40 mg once daily and mexiletine 200 mg twice daily were initiated. While mexiletine shortened the QTc (Figure 1B), it was discontinued before reassessment because of side effects. We identified an A-to-G base change at nucleotide position 5300 in exon 25 on the *SCN5A* gene by PCR and DNA sequencing. The base change led to a glutamine (Q)-to-arginine (R) substitution at residue 1476. The Q1476 residue is in a region of the *SCN5A* gene/ $\text{Na}_v1.5$ protein in Na^+ channels (Figure 2A) that has been extraordinarily highly conserved throughout evolution, from humans to zebra fish (not shown). Another highly conserved glutamine (Q1475,

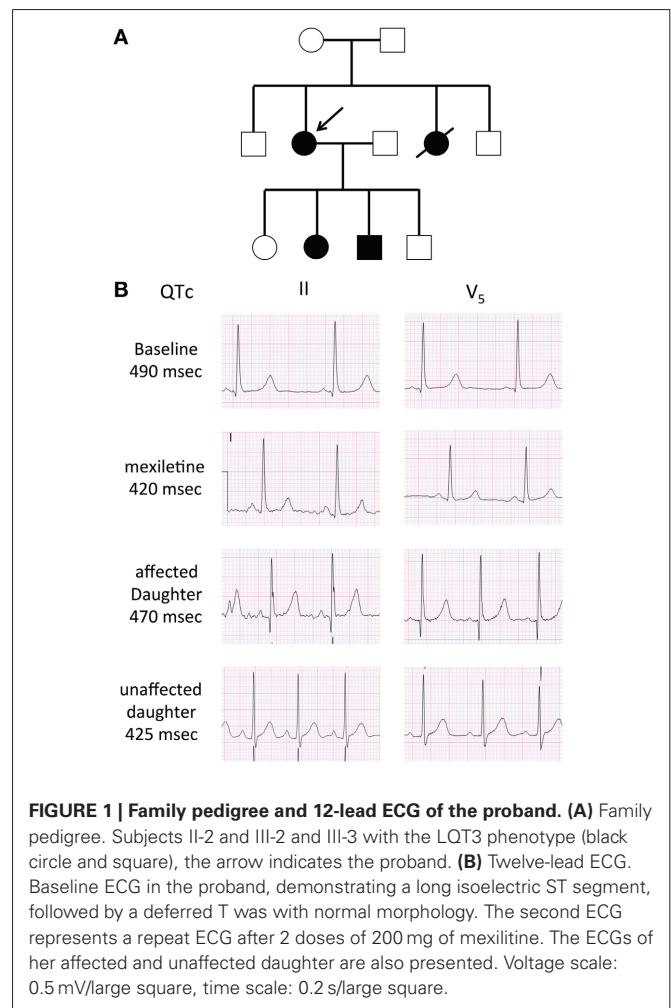


Figure 2A) was located upstream from the Q1476 residue. The mutation occurred in an important region of the Na^+ channel known as the inactivation gate (Figure 2B). An H558R polymorphism was associated with the novel Q1476R mutation. The four children of the index patient were examined and presented QTc values of 414, 444, 480, and 502 ms. Three of them underwent an exercise test and their QTc values went from 444 to 442 ms, 480 to 500 ms, and 502 to 522 ms, respectively. The two who presented with borderline QTc prolongation were subsequently confirmed to be carrying the Q1476R variant. The index patient remained free of symptoms during the 5-year follow-up period.

BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION

We investigated whether the novel mutation caused an alteration of the biophysical properties of the $\text{Na}_v1.5$ Na^+ channel that would explain the clinical phenotype of the index patient. Macroscopic Na^+ currents were recorded from tsA201 cells expressing either WT ($\text{Na}_v1.5/\text{WT}$) or mutant channels ($\text{Na}_v1.5/\text{Q1476R}$) co-transfected with the regulatory β_1 -subunit (see Methods for more details) (Figure 3A). The mutant Na^+ channel current exhibited no significant shift in the current-voltage (*I/V*) relationship, and the current density was similar

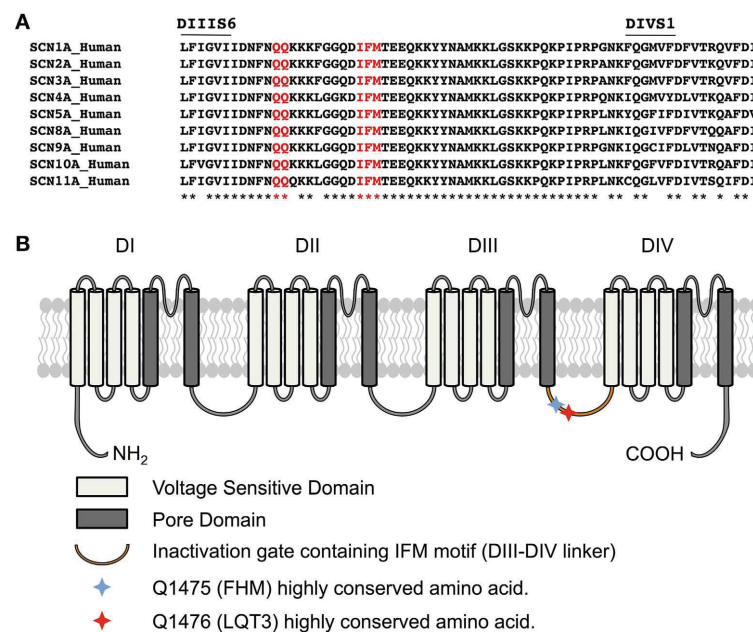


FIGURE 2 | Q1476 is within a highly conserved region. (A) Amino acid alignments of the region between transmembrane domains IIIS6 and IVS1 (III-IV linker) showing in red that glutamine 1475 and glutamine 1476 are highly conserved in human voltage-gated sodium channels. The IFM inactivation particle is displayed in red. **(B)** Schematic representation of the Na_v1.5 channel structure displaying voltage

sensitive domains, the segments forming the pore domain, and the inactivation gate. Q1475 and Q1476 are also indicated. The missense mutation of one these two amino acids leads to several pathologies, depending on the channel impacted. The mutation of Q1475 in Na_v1.1 causes familial hemiplegic migraine (FHM), whereas the mutation of Q1476 in Na_v1.5 causes LQT3 syndrome.

to that of the WT channel (WT: -739.1 ± 73.1 pA/pF, Q1476R: -690.8 ± 69.9 pA/pF) (Figure 3B, Table 1). This result is based on the measurement of the peak current which is defined as the maximal absolute current obtained with the stimulation protocol (see Figure 3 legend). This peak current corresponds to the value where the global conductance reaches its maximum. A small persistent Na⁺ current was recorded. The persistent Na⁺ current was investigated using a 400 ms two-pulse protocol, and it was measured as mean of the current between 100 and 350 ms. The magnitude of this persistent current was significantly ($p < 0.05$) different from that recorded from WT channels at -30 mV ($0.36 \pm 0.08\%$, $n = 13$ for WT channels, $0.74 \pm 0.11\%$, $n = 14$ for mutant channels) (Figure 3C, Table 1). SS activation (G_v) and inactivation curves were also studied (Figure 3D, Table 1). The G_v curve of the mutant Na⁺ channel showed no significant shift ($p = 0.340$ for $V_{1/2}$ and $p = 0.081$ for the slope factor). However, there was a 6.5 mV ($p < 0.05$) shift in the SS inactivation curve toward more positive voltages for the Q1476R mutant channel ($V_{1/2}$ Na_v1.5/Q1476R = -85.5 ± 0.4 mV, $n = 14$ vs. $V_{1/2}$ Na_v1.5/WT = -92.0 ± 1.3 mV, $n = 13$). The slope factor was not significantly affected ($p = 0.544$). The mutation did not induce any significant changes in the time course of the Na⁺ current decay or the recovery from inactivation (Figure 4).

The overlap of SS activation and inactivation of Na⁺ channels defines a range of voltages (i.e., window) where Na⁺ channels open, resulting in an inward Na⁺ current that could potentially depolarize the resting membrane potential and increase myocyte

excitability. The Q1476R mutation induced an increase in the overlap of Na⁺ channel activation and inactivation by shifting the inactivation to more positive potentials. This shift tended to expand the window and thus, the fraction of permanently activated channels. Figure 5A shows the predicted window currents of the WT and Q1476R mutant Na_v1.5 channels. The Q1476R mutation produced a ~ 7 -fold increase in the Na_v1.5 window current, suggesting that more channels had reopened within the window region. Figure 5B shows the increase in the window current together with the increase in the persistent component, suggesting that Q1476R had a higher probability to open at voltages ranging from -140 to $+20$ mV.

The persistent Na⁺ current can be attributed to the Na_v1.5 channel as it was blocked ($0.06 \pm 0.06\%$, $n = 5$) by 10 μ M of tetrodotoxin, a Na⁺ channel blocker (Figure 6). Mexiletine was seen to be efficient to treat the patient. The effect of this class I B antiarrhythmic was thus tested on the persistent Na⁺ current. 50 μ M of mexiletine importantly reduced the persistent Na⁺ current ($0.09 \pm 0.03\%$, $n = 5$) (Figure 6).

IN SILICO CHARACTERIZATION OF THE CHANGES INDUCED BY THE HETEROZYGOUS MUTATION Q1476R

The *in silico* characterization incorporates the heterozygous aspect of the mutation. This model is used to observe the effects of the mutation on several parameters including AP, Na⁺ window current I_{Na} (the large inward current surge simultaneous with AP upstroke is largely off scale), persistent Na⁺ current (I_{NaP}), Na⁺ and Ca²⁺ intracellular concentrations (Na_i and Ca_i). As a

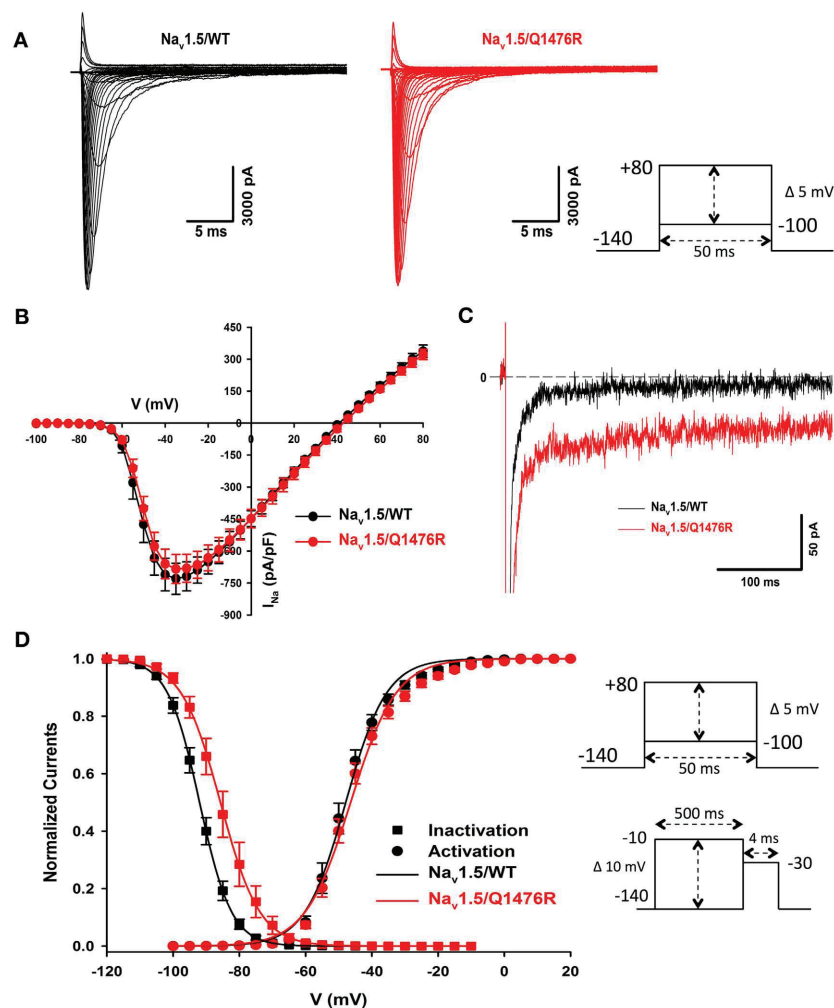


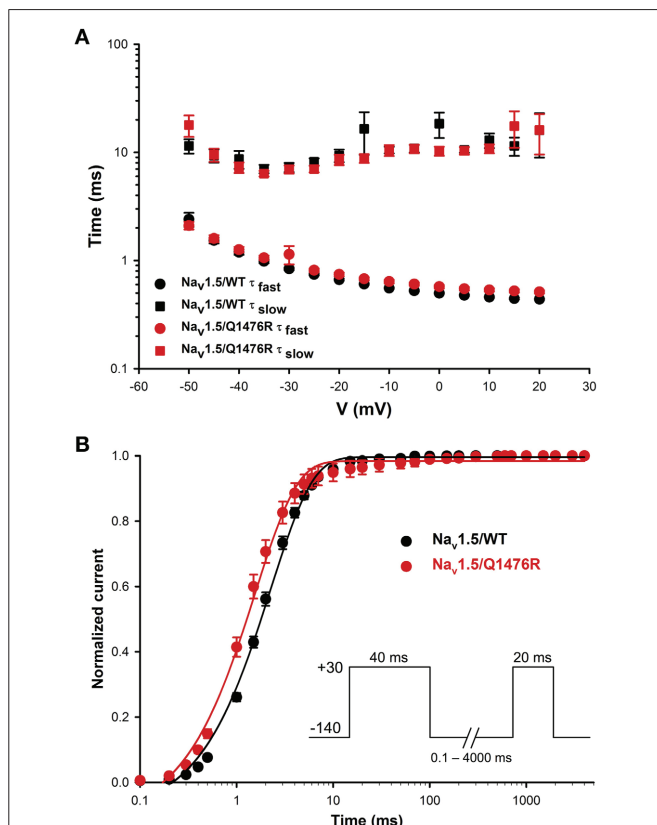
FIGURE 3 | Biophysical characterization of Na_v1.5/WT and the Q1476R mutant channels. (A) Representative whole-cell current traces of the WT (left) and Q1476R (right) channels. Currents were elicited using a voltage-clamp protocol where depolarizing pulses were applied for 50 ms from -100 to +80 mV in 5 mV increments (see protocol in inset). The zero current corresponds to the basal line shown at the beginning of each trace. (B) After normalization to cell capacitance, current-voltage (I-V) relationships were constructed for the Na_v1.5/WT ($n = 13$, black) and Q1476R ($n = 14$, red) channels. (C) Representative current traces obtained after a -30 mV depolarizing pulse showing INap. The Na_v1.5/WT channel trace is depicted in black while the Na_v1.5/Q1476R channel trace is depicted

in red. (D) Voltage dependence of SS activation (circles) or inactivation (squares) for the WT (black) and Q1476R (red) Na_v1.5 channels. A standard Boltzmann function was used to fit activation curves and to obtain the $V_{1/2}$ and given in **Table 1** [$G(V)/G_{\max} = 1/(1 + \exp(-(V - V_{1/2})/k))$]. Inactivation currents were obtained by applying conditioning pre-pulses to membrane potentials ranging from a holding potential of -140 to -10 mV for 500 ms in 5 mV increments and were then measured using a 4-ms pulse to -30 mV at each step (see protocol in inset). The recorded inactivation values were fitted to a standard Boltzmann equation [$I(V)/I_{\max} = 1/(1 + \exp((V - V_{1/2})/k)) + C$] to obtain the values given in **Table 1**.

rule, model simulations were conducted for at least a 2000 s cell lifetime to ensure that SS in all variables was reached.

With 1-Hz stimulations, at SS, the WT model shows an APD₉₀ of 454 ms and a Na_i of 11.94 mmol/L (central column, trace a, in **Figure 7A**, and **Table 2**). The model was then changed to the heterozygous condition (denoted as WR), with half of the INa current being WT and half being Q1476R. The first AP obtained in the WR condition had an APD₉₀ of 587 ms (trace b) without appreciable change in Na_i. Both Na⁺ window current and INap amplitudes were increased when the mutation was introduced

(2nd and 3rd panels from the top, respectively, central column of **Figure 7A**). This was consistent with estimates computed from the voltage-clamp data (**Figure 5**). The difference is that the magnitude of the mutation-induced increase in the window current and in the INap as evaluated in the heterozygous model was two-fold less than that reported in **Table 1**, since, in the WR model, only half of the current is of the mutated type. When running this heterozygous model to SS (trace c), Na_i expectedly increased, reaching 12.92 mmol/L, while APD₉₀ shortened to 513 ms. The diastolic Ca_i and Ca_i transients were also increased



(**Figure 7A**, lower panel, central column and **Table 2**). The instantaneous APD_{90} lengthening by 29% due to changing from WT to WR condition was reduced to 13% vs. WT when the WR model reached SS. Most of the lengthening was thus counterbalanced by changes that occurred during regular stimulations for longer periods (typically 2000 s).

The same simulations were conducted at 1.5 Hz until SS (**Figure 7A**, 3rd column, and **Table 2**). APD_{90} and Na_i , respectively stabilized at 392 ms and 13.59 mmol/L for WT (trace a). After the switch to the WR model, the first AP (trace b) had an APD_{90} of 471 ms (Na_i remained unchanged). After reaching SS (trace c), APD_{90} shortened to 436 ms and Na_i increased to 14.57 mmol/L. At SS, the diastolic Ca_i and Ca_i transients had increased in the WR model. The increases were larger than

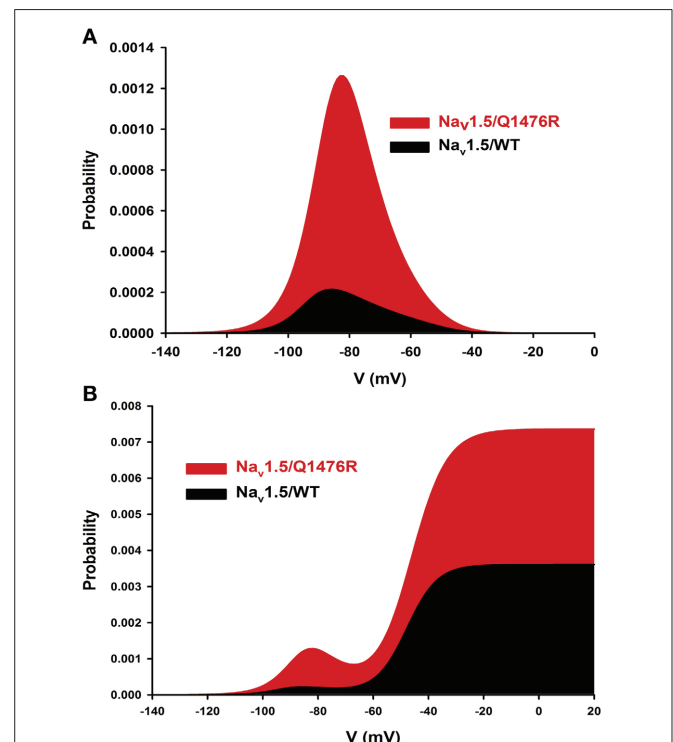
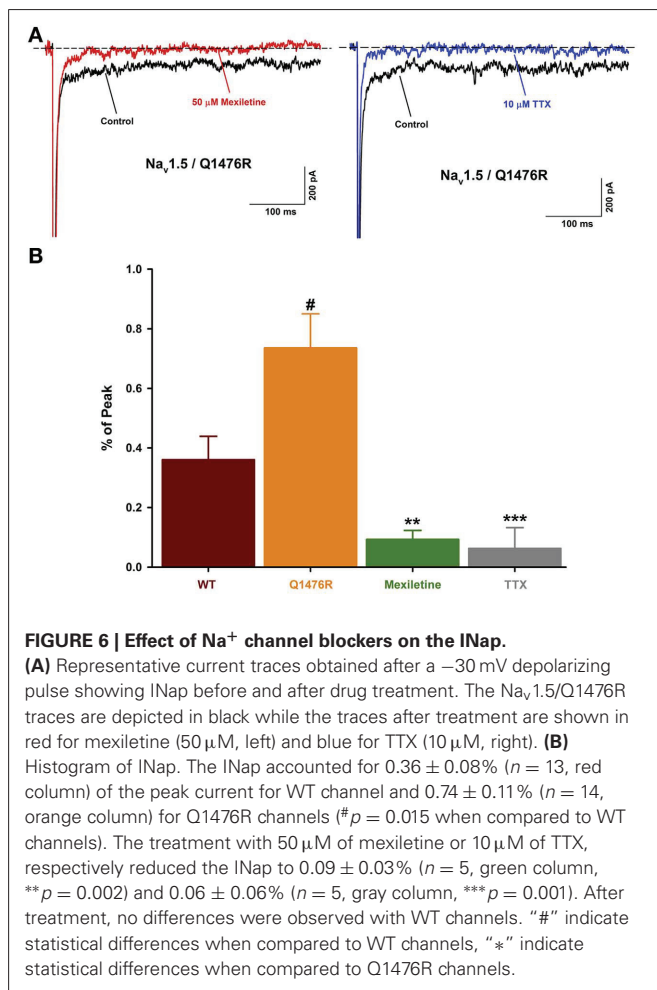


FIGURE 5 | $Na_v1.5/WT$ and Q1476R window currents. (A) The window current is defined as the overlap between activation and inactivation. The window current was obtained using the following equation: $(1/(1 + \exp((V_{1/2activation} - V)/k_{activation})) \times ((1 - C)/(1 + \exp((V - V_{1/2inactivation})/k_{inactivation})) + C)$. **(B)** The INap component was added to the window current of the WT or the Q1476R channel.

those seen at 1 Hz (**Figure 7A**, lower panel, 3rd column and **Table 2**).

To test the effect of bradycardia, the stimulation rate was lowered from 1 Hz to 0.5 Hz. At SS, the WT model had a longer APD_{90} (558 ms) and a lower Na_i (9.84 mmol/L) than at 1 Hz. In the WR model at 0.5 Hz, APD_{90} and Na_i reached SS values of 705 ms and 10.95 mmol/L (**Table 3**), while the diastolic Ca_i and Ca_i transients decreased (**Figure 7A**, 1st column, lower panel and **Table 3**). To determine the effect of changes in Na_i on APD_{90} , changes in Na_i were applied instantaneously to the model in several settings (**Figure 7B**).

In the WT model, from SS at 1 Hz, setting Na_i to its value at SS at 0.5 Hz produced an APD_{90} of 542 ms (**Figure 7B**, left panel). This was comparable to the SS APD_{90} at 0.5 Hz when Na_i was not imposed (558 ms). Likewise, when SS Na_i was imposed in the WR model at 0.5 and 1 Hz, the APD_{90} s of the next AP were respectively 683 and 515 ms, vs. 705 and 513 ms at SS when Na_i was not imposed (left panel of **Figure 7B** and **Table 3**). At 1 Hz, in WR model under SS, changing Na_i to WT SS value produced APD_{90} of 582 ms. This value is close to that of the first WR AP (APD_{90} of 587 ms). Then, changing to WT produced APD_{90} of 451 ms which is similar to SS WT APD_{90} of 454 ms (middle panel of **Figure 7B** and **Table 1**). At 1.5 Hz (**Figure 7B**, right panel and **Table 2**), APD_{90} produced by changing Na_i values were very close



to those in the original simulations at SS. Thus, applying solely Na_i changes reproduced most of the APD₉₀ decrease observed at SS.

In the TNNP 2004 model, the only two ion transfer mechanisms that depend on Na_i are the Na⁺-K⁺ pump (INaK) and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (INaCa) (Ten Tusscher et al., 2004). Their activity increase when Na_i is increased. In **Figure 8A**, the two upper panels are a repeat of the first and third panels from the top in the middle column of **Figure 7**. The lower panel of **Figure 8A** is new and reports the time course of the INaK and INaCa currents during an AP. There was a large immediate increase in the duration of the first AP recorded after switching the model to the WR condition (**Figure 8A** upper panel, compare traces a and b). This was a direct effect of the increase in the conductance of the INap (middle panel, blue vs. black trace). The magnitudes of the INaK and the INaCa exchanger currents followed the changes in the membrane potential (compare blue and black traces in the lower panel). We further stimulated the model at 1 Hz until SS. The APD₉₀ shortened (**Figure 8A** upper panel, trace c, orange line). While the changes in INap magnitude just followed the changes in membrane voltage values (orange vs. blue trace, middle panel), the magnitudes of both the INaK and the INaCa currents increased (orange vs. blue trace, lower panel).

The increase in the INaK current was small compared to the 30% increase in the magnitude of the INaCa exchanger current.

As seen in **Figure 7**, there was a concomitant raise in the diastolic Ca_i and in the Ca_i transients in tandem with the increase in Na_i when the stimulations were applied until SS. To isolate the effect of the increase in Na_i, we started with the WR model stabilized at 1 Hz and instantaneously changed Na_i to that of the SS WT model (**Figure 8B**, black to blue traces). The model was then instantaneously returned to the WT model (**Figure 8B**, blue to orange traces). The changes in APD₉₀, INaK, and INaCa were comparable to those in **Figure 8A**. This indicates that, when Na_i was increased, the reverse mode of INaCa provided the main increase in the outward current that caused the shortening of the APD₉₀.

A possible contribution of the increase in window current in the effects of the mutation was tested in the model at steady-state at 1 Hz. The diastolic membrane voltage in the WT situation was -85.9 mV and the threshold for stimulation was 21.4 pA/pF, whereas in the WR situation, they were -85.5 mV and 20.8 pA/pF, respectively. Thus, there was a 0.4 mV depolarization and a 2.8% decrease in stimulation threshold. Further, when the window current of the WR model was made identical to that in the WT model, by suppressing any changes in steady-state activation and inactivation curves, the diastolic membrane voltage was -85.7 mV and stimulation threshold 21.3 pA/pF. Thus, although slightly, the window current appeared to increase cell excitability.

DISCUSSION

We biophysically characterized a novel LQT3 mutation (Q1476R) found in a previously symptomatic 34-year-old female with a classic LQT3 ECG phenotype. The Q1476 residue is a highly conserved amino acid in all Na⁺ channels (**Figure 2**) throughout evolution, from humans to zebra fish. Interestingly, a second highly conserved Q residue (Q1475) (**Figure 2**) was found immediately upstream from Q1476. These two residues were located in the inactivation gate upstream from the IFM motif. Given their location, they are likely to play a role in the inactivation process. Moreover, the Q1489H missense substitution on SCN1A encoding the Na_v1.1 neuronal voltage-gated Na⁺ channel (the Q1475 homolog in Na_v1.5) is highly expressed in the central nervous system, including the retina, and is found in patients with familial hemiplegic migraine (FHM, **Figure 2B**) (Vahedi et al., 2009). Unfortunately, no biophysical characterization has been reported for this mutation. We can speculate that a gain-of-function due to this mutation may be the cause of FHM.

The present paper provides support for the concept that the increase in the window current and the increase in the TTX sensitive persistent current due to the LQT3 mutation (Q1476R) cause LQTS. This is consistent with all studies indicating that mutations in SCN5A causing LQTS are related to a gain-of-function (Schwartz et al., 2012).

The treatment with 50 μM of mexiletine importantly reduced the INap observed on Q1476R mutant channels. This might explain the beneficial effects of mexiletine treatment on the patient. Unfortunately, the nausea due to mexiletine have imposed the discontinuation of the treatment.

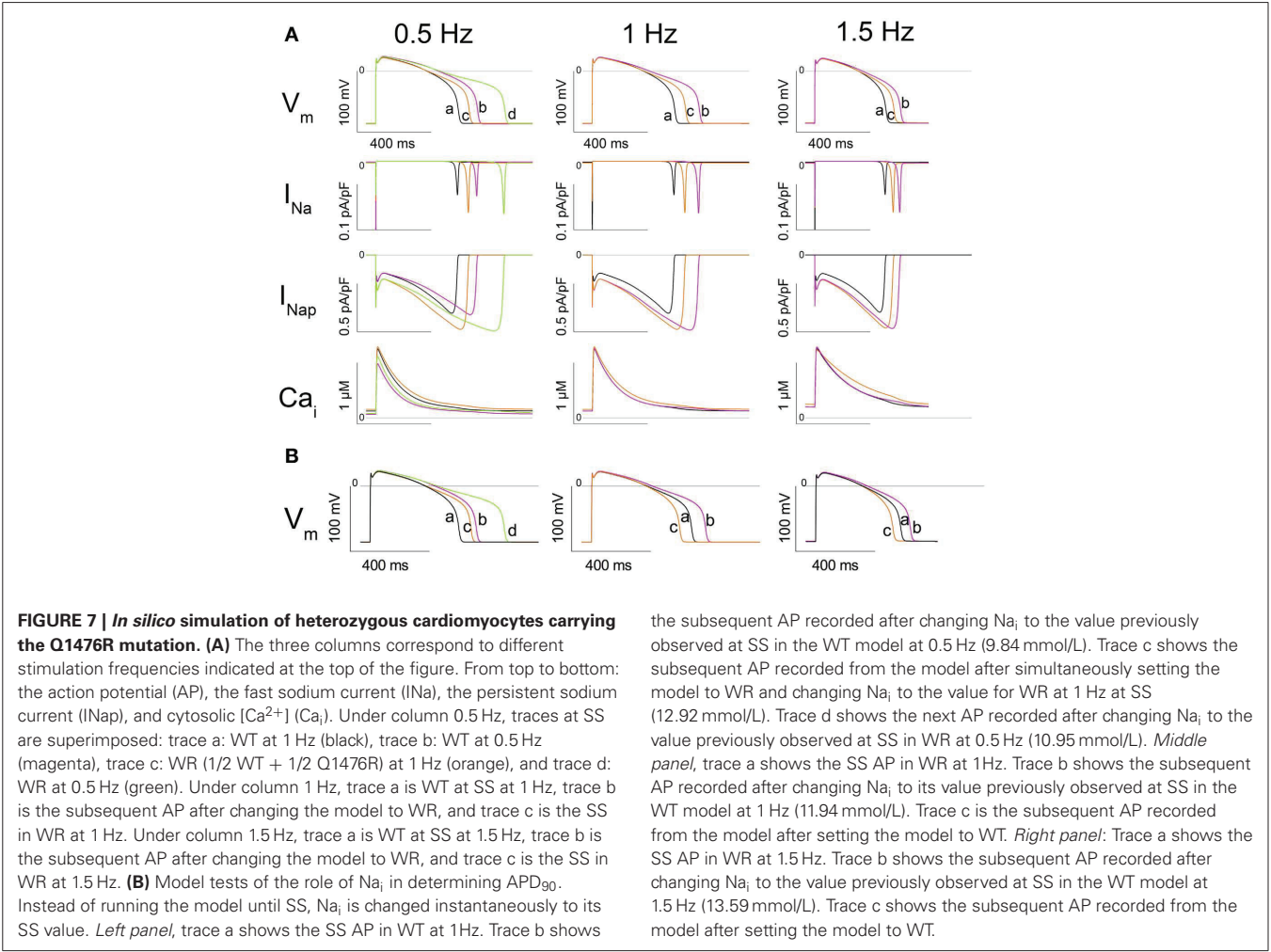
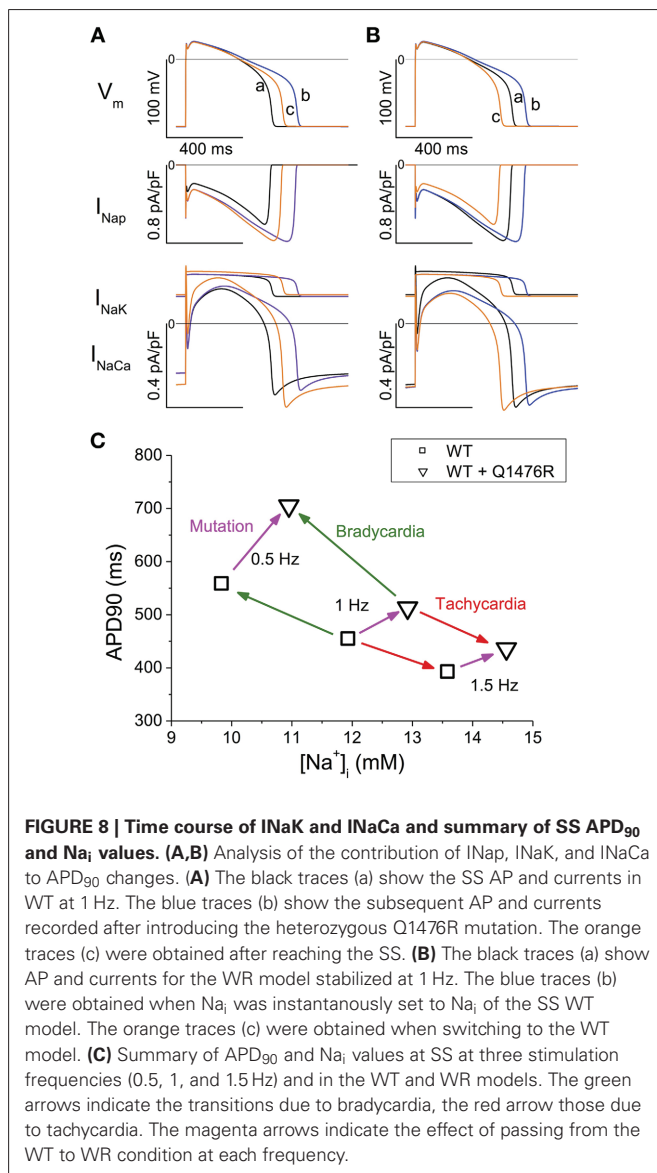


Table 2 APD_{90} , Na_i , and diastolic Ca_i at steady state recorded in the model during 1- and 1.5-Hz stimulation.				
Stimulation frequency	Parameter	WT	WR first AP	WR
1 Hz	APD_{90} (ms)	454	587	513
	Na_i (mmol/L)	11.94	11.94	12.92
	Diastolic Ca_i (μ mol/L)	0.109	0.109	0.135
	APD_{90} in Na_i tests (ms)	451	582	
1.5 Hz	APD_{90} (ms)	392	471	436
	Na_i (mmol/L)	13.59	13.59	14.57
	Diastolic Ca_i (μ mol/L)	0.179	0.177	0.221
	APD_{90} in Na_i tests (ms)	396	484	

Table 3 Effect of bradycardia on APD_{90} , Na_i , and diastolic Ca_i at steady state.				
	WT at 1 Hz	WT at 0.5 Hz	WR at 1 Hz	WR at 0.5 Hz
APD_{90} (ms)	454	558	513	705
Na_i (mmol/L)	11.94	9.84	12.92	10.95
Diastolic Ca_i (μ mol/L)	0.109	0.057	0.135	0.071
APD_{90} in Na_i test (ms)		542	515	683

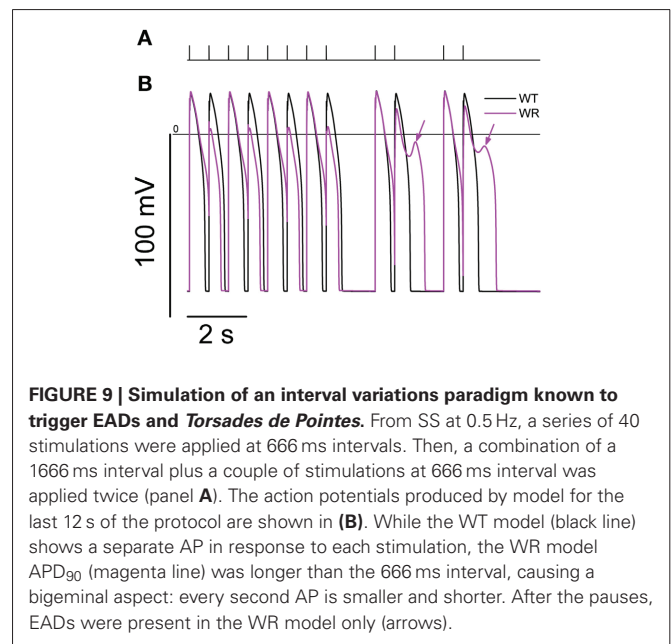
As expected from its localization, the mutation impacts the inactivation process. The Q1476R mutation resulted in a depolarizing shift of inactivation, which tended to increase the overlap of activation and inactivation gating (Figure 5). At voltages within this overlap region, Na^+ channels are partially but not fully inactivated, thus increasing the potential for persistent window

currents (Attwell et al., 1979). At -50 mV, the peak window current probability predicts that a small percentage (0.1%) of the mutant channels will be persistently activated. The resulting inward Na^+ current at resting membrane potentials could depolarize cardiac myocytes, leading to an increase in their excitability. The increase in persistent current is not surprising as the mutation is localized in the inactivation gate (DIII-DIV linker). The effect of this mutation on the inactivation process would be a decrease of the probability for channels to enter an inactivated state. Consequently, a small amount of $Na_v1.5$ Q1476R channels will not inactivate after the rapid activation. Similar mechanisms



are believed to underlie the increased excitability of sensory neurons harboring inherited human pain disorder mutations that produce shifts in $Na_v1.7$ activation and inactivation of similar polarity and magnitude as those observed in the present study (Harty et al., 2006; Rush et al., 2006; Dib-Hajj et al., 2010).

The *in silico* model confirmed the arrhythmogenic potential of the Q1476R mutation. When the model was changed to the heterozygous mutated paradigm, there was an immediate effect that prolonged APD_{90} . Continued stimulation caused a partial reversion of this effect when SS was reached. At the same time, both Na_i and Ca_i increased. **Figure 8C** summarizes the effects of the mutation combined with the heart rate on APD_{90} and Na_i . At SS, the accumulation of Na^+ ions, related both to an elevated frequency and to the presence of the mutation, tended to shorten APD_{90} . This would in turn tend to moderate the LQT effect of the mutation at elevated heart rates such as under effort or moderate stress. The gain-of-function due to a persistent



Na^+ current may thus protect against arrhythmogenesis related to a limited increase in heart rate. However, as was seen in the model, an overload of Ca_i stores may appear at higher rates and may trigger arrhythmias (Christe et al., 2008). Our data are consistent with published experimental and model studies (Pieske and Houser, 2003; Noble and Noble, 2006; Undrovinas et al., 2006; Soliman et al., 2012). When combined with elevated Ca^{2+} entry under adrenergic stress, arrhythmias may appear due to early or late after-depolarizations. Under elevated Ca_i conditions, a decrease in the L-type Ca^{2+} current ought to take place due to the decrease in the transmembrane $[Ca^{2+}]$ gradient and to the accelerated decay by calcium-dependent inactivation. Nevertheless, its contribution to the overall effect should be minor. The slowly activating potassium current I_{Ks} was shown to be increased by elevation of Ca_i , as due to a relief of KCNQ1 inactivation by calmodulin in a Ca^{2+} dependent way (Ghosh et al., 2006). This feature was absent in the model. Such an effect would enhance the frequency-dependent effect observed in the model, resulting into a further shortening of the AP at high frequencies that would be larger in the WR than in the WT situation.

A combination of interval variations known to trigger EADs and *torsades de pointes* (El-Sherif et al., 1999; Viswanathan and Rudy, 1999; Tan et al., 2006) has been tested in the model. EADs appeared in the WR condition while the WT remained unaffected (**Figure 9**). This is consistent with emotional stress and exercise as known triggers of arrhythmias in LQT3 (Schwartz et al., 2001).

Conversely, bradycardia causes a lower Na_i and a lengthening of APD, which are well-known features of bradycardia (Faber and Rudy, 2000). Changes in diastolic Ca_i and Ca_i transients are also observed. Each of these may change the magnitude of ionic currents and exchangers. Elevated Na_i is known to cause an activation of the Na/K ATPase pump and an increase in the reverse mode Na-Ca exchanger current. Both of these processes

may shorten APD (Armoundas et al., 2003), as well as the increase in Ca^{2+} -dependent inactivation of the Ca^{2+} current due to elevated Ca_i (Carmeliet, 2006). Our simulations showed that most of the APD changes were due to changes in Na_i , mainly through a lower INaCa. The LQT effect of the mutation is likely to be more serious at low heart rates, as illustrated in our simulations where APD₉₀ reached very critical values around 700 ms in the heterozygous model. Thus, the carrier of the mutation may be preferentially sensitive to factors triggering arrhythmias when at rest, which is a characteristic of LQT3 syndrome. During activity, APD shortening, due to increased entry of Na^+ ions, may protect the carrier against arrhythmias. These results should be qualitatively reproduced in other models of human ventricular myocytes, since the basic features of the Na_i homeostasis ought to obey to the same constraints. Furthermore, the functional consequences, as analyzed here for mutation Q1476R, may in principle be extended for other LQT3 mutations involving an increase in persistent and window currents. The intracellular Na^+ overload, as related to the gain-of-function in Na^+ channels, is proper to LQT3 and is unlikely in LQT syndromes related to potassium channel dysfunctions. This might be taken into account for personalized prevention and therapy of LQT3 patients.

LIMITATIONS OF THE *IN SILICO* MODEL

The basic TNNP model assumed no fraction of INap. However, the magnitudes of the INaCa, INaK, and Na^+ background currents had been adjusted to account for the high Na_i in ventricular human myocytes. The present modified model may thus have an

overall excess of Na^+ entry. A late Na^+ current was added to the model in the WT condition, and its magnitude was limited to one-third of the fraction of the peak Na^+ current found in tsA201 cells. This caused the APD₉₀ in the WT configuration to be 454 ms vs. 325 ms in the basic TNNP model, whereas values of ~370 or 400 ms have been reported by Li et al. (1998, 1999) in human ventricular myocytes. As a result, the effects of the mutation may have been overemphasized in the present simulations.

Several ion channels have been shown to be modulated by intracellular Ca^{2+} , either directly or through intracellular effectors (e.g., calmodulin), such modulations were not included in the model. Several additional channels (e.g., stretch-sensitive channels) found in mammalian ventricular myocytes were neither included. A number of investigations in human ventricular myocytes are still needed to document their formulation.

Lastly, this model assumes that no changes other than those due to the Na^+ channel mutation took place. There are reasons to doubt this, since a permanent Na^+ and Ca^{2+} overload, as seen here in the WR model, are known triggers of remodeling of ion channel densities and excitation-contraction coupling efficiency in cardiac cells, which may have taken place over the long-term in carriers of the mutation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Quebec (HSFQ), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MT-13181), and the Heart and Stroke Foundation of Ontario (T6730).

REFERENCES

- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., and Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* 460, 223–237. doi: 10.1007/s00424-009-0761-0
- Armoundas, A. A., Hobai, I. A., Tomaselli, G. F., Winslow, R. L., and O'Rourke, B. (2003). Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circ. Res.* 93, 46–53. doi: 10.1161/01.RES.0000080932.98903.D8
- Attwell, D., Cohen, I., Eisner, D., Ohba, M., and Ojeda, C. (1979). The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* 379, 137–142. doi: 10.1007/BF00586939
- Carmeliet, E. (2006). Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17(Suppl. 1), S2–S7. doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00378.x
- Christe, G., Chahine, M., Chevalier, P., and Pasek, M. (2008). Changes in action potentials and intracellular ionic homeostasis in a ventricular cell model related to a persistent sodium current in SCN5A mutations underlying LQT3. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 96, 281–293. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.023
- Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., and Waxman, S. G. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 325–347. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153234
- El-Sherif, N., Caref, E. B., Chinushi, M., and Restivo, M. (1999). Mechanism of arrhythmogenicity of the short-long cardiac sequence that precedes ventricular tachyarrhythmias in the long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 1415–1423. doi: 10.1016/S0735-1097(98)00700-1
- Faber, G. M., and Rudy, Y. (2000). Action potential and contractility changes in $[\text{Na}^+](i)$ overloaded cardiac myocytes: a simulation study. *Biophys. J.* 78, 2392–2404. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76783-X
- Fink, M., and Noble, D. (2009). Markov models for ion channels: versatility versus identifiability and speed. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 2161–2179. doi: 10.1098/rsta.2008.0301
- Gellens, M. E., George, A. L. Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., et al. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 554–558. doi: 10.1073/pnas.89.2.554
- Ghosh, S., Nunziato, D. A., and Pitt, G. S. (2006). KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ. Res.* 98, 1048–1054. doi: 10.1161/01.RES.0000218863.44140.f2
- Gosselin-Badaroudine, P., Keller, D. I., Huang, H., Pouliot, V., Chatelier, A., Osswald, S., et al. (2012). A proton leak current through the cardiac sodium channel is linked to mixed arrhythmia and the dilated cardiomyopathy phenotype. *PLoS ONE* 7:e38331. doi: 10.1371/journal.pone.0038331
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100. doi: 10.1007/BF00656997
- Harty, T. P., Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Blackman, R., Hisama, F. M., Rose, J. B., et al. (2006). Na(V)1.7 mutant A863P in erythromelalgia: effects of altered activation and steady-state inactivation on excitability of nociceptive dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 26, 12566–12575. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3424-06.2006
- Huang, H., Priori, S. G., Napolitano, C., O'Leary, M. E., and Chahine, M. (2011). Y1767C, a novel SCN5A mutation, induces a persistent Na^+ current and potentiates ranolazine inhibition of Nav1.5 channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H288–H299. doi: 10.1152/ajpheart.00539.2010
- Iyer, V., Mazhari, R., Winslow, R. L. (2004). A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys. J.* 87, 1507–1525. doi: 10.1529/biophysj.104.043299
- Jurman, M. E., Boland, L. M., Liu, Y., and Yellen, G. (1994). Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques* 17, 876–881.
- Li, G. R., Feng, J., Yue, L., and Carrier, M. (1998). Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human

- right ventricle. *Am. J. Physiol.* 275, H369–H377.
- Li, G. R., Yang, B., Feng, J., Bosch, R. F., Carrier, M., and Nattel, S. (1999). Transmembrane ICa contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 276, H98–H106.
- Margolskee, R. F., McHendry-Rinde, B., and Horn, R. (1993). Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* 15, 906–911.
- Moreau, A., Keller, D. I., Huang, H., Fressart, V., Schmied, C., Timour, Q., et al. (2012). Mexiletine differentially restores the trafficking defects caused by two brugada syndrome mutations. *Front. Pharmacol.* 3:62. doi: 10.3389/fphar.2012.00062
- Nagatomo, T., Fan, Z., Ye, B., Tonkovich, G. S., January, C. T., Kyle, J. W., et al. (1998). Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPK Na⁺ channels. *Am. J. Physiol.* 275, H2016–H2024.
- Noble, D., and Noble, P. J. (2006). Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* 92(Suppl. 4), iv1–iv5. doi: 10.1136/hrt.2005.078782
- Pasek, M., Simurda, J., Orchard, C. H., and Christie, G. (2008). A model of the guinea-pig ventricular cardiac myocyte incorporating a transverse-axial tubular system. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 96, 258–280. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.022
- Pieske, B., and Houser, S. R. (2003). [Na⁺]_i handling in the failing human heart. *Cardiovasc. Res.* 57, 874–886. doi: 10.1016/S0008-6363(02)00841-6
- Priebe, L., and Beuckelmann, D. J. (1998). Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ. Res.* 82, 1206–1223. doi: 10.1161/01.RES.82.11.1206
- Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D., Liu, S., Cummins, T. R., Black, J. A., and Waxman, S. G. (2006). A single sodium channel mutation produces hyper- or hypoexcitability in different types of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8245–8250. doi: 10.1073/pnas.0602813103
- Schwartz, P. J., Crotti, L., and Insolia, R. (2012). Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 5, 868–877. doi: 10.1161/CIRCEP.111.962019
- Schwartz, P. J., Priori, S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., et al. (2001). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103, 89–95. doi: 10.1161/01.CIR.103.1.89
- Soliman, D., Wang, L., Hamming, K. S., Yang, W., Fatehi, M., Carter, C. C., et al. (2012). Late sodium current inhibition alone with ranolazine is sufficient to reduce ischemia- and cardiac glycoside-induced calcium overload and contractile dysfunction mediated by reverse-mode sodium/calcium exchange. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 325–332. doi: 10.1124/jpet.112.196949
- Tan, H. L., Bardai, A., Shimizu, W., Moss, A. J., Schulze-Bahr, E., Noda, T., et al. (2006). Genotype-specific onset of arrhythmias in congenital long-QT syndrome: possible therapy implications. *Circulation* 114, 2096–2103. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.642694
- Tang, Q., Ma, J., Zhang, P., Wan, W., Kong, L., and Wu, L. (2012). Persistent sodium current and Na⁺/H⁺ exchange contributes to the augmentation of the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange during hypoxia or acute ischemia in ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 463, 513–522. doi: 10.1007/s00424-011-1070-y
- Ten Tusscher, K. H., Bernus, O., Hren, R., and Panfilov, A. V. (2006). Comparison of electrophysiological models for human ventricular cells and tissues. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 90, 326–345. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.015
- Ten Tusscher, K. H., Noble, D., Noble, P. J., and Panfilov, A. V. (2004). A model for human ventricular tissue. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1573–H1589. doi: 10.1152/ajpheart.00794.2003
- Undrovinas, A. I., Belardinelli, L., Undrovinas, N. A., and Sabbah, H. N. (2006). Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17(Suppl. 1), S169–S177. doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00401.x
- Vahedi, K., Depienne, C., Le Fort, D., Riant, F., Chaine, P., Trouillard, O., et al. (2009). Elicited repetitive daily blindness: a new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations. *Neurology* 72, 1178–1183. doi: 10.1212/01.wnl.0000345393.53132.8c
- Viswanathan, P. C., and Rudy, Y. (1999). Pause induced early afterdepolarizations in the long QT syndrome: a simulation study. *Cardiovasc. Res.* 42, 530–542. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00035-8
- Wong, J. A., Gula, L. J., Klein, G. J., Yee, R., Skanes, A. C., and Krahn, A. D. (2010). Utility of treadmill testing in identification and genotype prediction in long-QT syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 3, 120–125. doi: 10.1161/CIRCEP.109.907865

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

Received: 27 June 2013; accepted: 11 September 2013; published online: 01 October 2013.

Citation: Moreau A, Krahn AD, Gosselin-Badaroudine P, Klein GJ, Christé G, Vincent Y, Boutjdir M and Chahine M (2013) Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation. *Front. Pharmacol.* 4:126. doi: 10.3389/fphar.2013.00126

This article was submitted to *Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies*, a section of the journal *Frontiers in Pharmacology*.

Copyright © 2013 Moreau, Krahn, Gosselin-Badaroudine, Klein, Christé, Vincent, Boutjdir and Chahine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APPENDIX

Equations used in the TNNP model:

WT is a variable taking three possible values: WT = 1 for a pure WT cell, WT = 0.5 for the heterozygous condition and WT = 0 when all channels are mutated.

$$g_{NaWT} = WT \cdot 14.838$$

$$g_{NaQ1476R} = (1 - WT) \cdot 14.838 \cdot (1 - 0.02)$$

$$i_{Na_{fast}WT} = g_{NaWT} \cdot m_{WT}^3 \cdot h_{WT} \cdot (V - E_{Na})$$

$$m_{infWT} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+53.6}{-7.4}}}$$

$$i_{Na_{fast}Q1476R} = g_{NaQ1476R} \cdot m_{Q1476R}^3 \cdot h_{Q1476R} \cdot (V - E_{Na})$$

$$m_{infQ1476R} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+51.3}{-8.2}}}$$

$$\tau_m = \frac{0.5 \cdot \left(\frac{1}{101.6 \cdot e^{V \cdot 0.1135} + 0.022} + 68 \cdot e^{-0.0717 \cdot V} + 0.0001 \right)}{4.83}$$

$$h_{infWT} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+86.5}{4.4}}}$$

$$h_{infQ1476R} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+80.6}{4.3}}}$$

$$\tau_h = \frac{0.5 \cdot \left(\frac{1}{1.1381 \cdot 10^{-6} \cdot e^{-0.1017 \cdot V} + 6.537 \cdot e^{0.08016 \cdot V}} + 0.0005 \right)}{4.83}$$

$$g_{NapsWT} = \frac{WT \cdot 14.838 \cdot 0.0019}{fm}$$

$$fm = 3$$

$$g_{NapsQ1476R} = \frac{(1 - WT) \cdot 14.838 \cdot (1 - 0.02) \cdot 0.0033}{fm}$$

$$i_{NapsWT} = g_{NapsWT} \cdot m_{infWT}^3 \cdot (V - E_{Na})$$

$$i_{NapsQ1476R} = g_{NapsQ1476R} \cdot m_{infQ1476R}^3 \cdot (V - E_{Na})$$

$$i_{Na} = i_{Na_{fast}WT} + i_{Na_{fast}Q1476R} + i_{NapsWT} + i_{NapsQ1476R}$$

4.2 La mutation R148W du gène KCNH2, exprimée à l'état hétérozygote, diminue la densité du courant hERG et prédispose à des arythmies

Article : **The variant hERG/R148W associated with LQTS is a mutation that reduces current density on coexpression with the WT**

Asma Mechakra, Yohann Vincent, Philippe Chevalier, Gilles Millat, Eckhard Ficker, Marek Jastrzebski, Hugo Poulin, Valérie Pouliot, Mohamed Chahine, Georges Christé
Article publié dans *Gene* (2013)

4.2.1 Introduction

Cette étude porte sur l'exploration électrophysiologique du variant R148W du gène KCNH2. Ce variant résulte de la substitution d'une cytosine en position 442 du gène par une thymine (*c.442C>T*) et conduit au remplacement d'un résidu arginine par un résidu phénylalanine à la position 148 de la protéine (p.R148W). Ce variant a été identifié chez un jeune enfant décédé par mort subite pendant le sommeil (reçu dans le service de Rythmologie du Pr. Philippe Chevalier, hôpital Louis Pradel). Ce variant a ensuite été détecté par le service de Génétique du Centre de Biologie Est de Lyon (Pr. Robert Rousson, Dr. Gilles Millat) chez plusieurs membres de sa famille, dont certains présentant un intervalle QT allongé (Figure 1 et Table 1 de Mechakra et al., 2013) et chez une femme adulte ayant un QTc de plus de 500 ms, un bloc atrio-ventriculaire et des torsades de pointes (Figure 2 de Mechakra et al., 2013). Ce variant avait déjà été rapporté, notamment dans des cas d'arythmies ventriculaires sévères mais aussi, plus rarement, chez des sujets sains (Kapa et al., 2009; Fressart et al., 2010). Ceci posait la question de décider si ce variant devait être considéré comme une mutation ou un polymorphisme.

Pour tenter de répondre à cette question, une étude sur les ovocytes de Xénope a été réalisée lors d'un séjour à Québec dans le laboratoire du professeur M. Chahine (Institut Universitaire en Santé Mentale, Québec City, QC, Canada).

4.2.2 Résultats et discussion

L'exploration fonctionnelle du variant R148W de hERG a été réalisée par injection d'ARM messager dans les ovocytes de Xénope. L'étude a montré que cette mutation, à l'état

homozygote, n'induisait aucune modification des cinétiques ni de l'amplitude du courant I_{Kr} en comparaison au WT (369 ± 76 nA pour R148W contre 342 ± 55 nA pour le WT, Figure 4 de Mechakra et al., 2013). Cependant, en coexpression avec le WT, nous avons observé une diminution de l'amplitude du courant de l'ordre de 29% (243 ± 35 nA) sans changement des cinétiques (Figure 4 de Mechakra et al., 2013)). Un western-blot des protéines WT et mutées n'a montré aucune altération de leur maturation dans les deux conditions (Figure 3 de Mechakra et al., 2013).

Cette mutation est localisée au niveau du domaine proximal de la protéine. Ce domaine jouerait un rôle important dans le processus d'activation lente du canal (Gomez-Varela et al., 2003; Vilorio et al., 2000). Notre étude a montré que le remplacement de l'arginine 148 par un tryptophane n'altère pas le rôle du domaine proximal dans le maintien de l'activation lente du canal hERG, bien que ces deux acides aminés aient des propriétés physico-chimiques très différentes. De même, aucune modification des cinétiques de désactivation et d'inactivation n'a été mise en évidence (Figure 5 de Mechakra et al., 2013). A notre connaissance, aucune autre mutation du gène hERG n'a été décrite sur ce même acide aminé.

La diminution d'amplitude qui est observée seulement en coexpression avec le WT peut être expliquée en supposant que certains canaux composés d'hétérotétramères de sous-unités WT et de sous-unités R148W ne sont pas fonctionnels, alors que les autres canaux exprimés à la surface sont tout à fait fonctionnels. Afin de valider cette hypothèse, on pourrait faire exprimer aux ovocytes de Xénope des constructions d'ARNm codant pour le canal hERG entier avec les 4 sous-unités sur le même brin d'ARNm. En faisant varier les positions des différentes sous-unités WT et mutées (WWMM, WMWM, WMMW...), on pourrait alors en déduire quelle construction est non fonctionnelle.

La diminution d'amplitude du courant I_{Kr} , comme observée ici pour le courant hERG, pourrait rendre compte du syndrome de QT long de certains porteurs. Nous avons exploré l'effet de cette diminution d'amplitude dans un modèle mathématique de cellule ventriculaire humaine. La mutation R148W, à l'état hétérozygote, y induit une augmentation (+6,6%) de la durée des potentiels d'action par rapport à la condition WT (APD90 = 345 ms pour R148W+WT contre 324 ms pour le WT, Figure 6 de Mechakra et al., 2013).

Tous les résultats présentés dans cette étude ont été enregistrés dans l'ovocyte de Xénope. L'extrapolation aux cellules cardiaques humaines des patients porteurs de la mutation présente des limitations qu'il est important de noter. Tout d'abord, les expérimentations n'ont pas été effectuées sur des cellules humaines, ni même de mammifères. Le fonctionnement de la machinerie cellulaire des ovocytes de Xénope est

sûrement différent de celui des cardiomyocytes humains. De plus, l'exploration fonctionnelle de ce mutant a été faite à température ambiante (environ 22°C), loin de la température physiologique de 37°C. Or de nombreux mécanismes sont modifiés par la température, notamment le repliement des protéines et l'adressage des canaux à la membrane. Enfin, aucune sous-unité régulatrice du courant I_{Kr} , telle que KCNE1 ou KCNE2, n'a été coexprimée dans les ovocytes.

D'après nos résultats, nous concluons que le variant R148W de hERG devrait être considéré comme une mutation plutôt qu'un polymorphisme.

4.2.3 Publication



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

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

The variant *hERG/R148W* associated with LQTS is a mutation that reduces current density on co-expression with the WT[☆]

Asma Mechakra^{a,1}, Yann Vincent^{a,1}, Philippe Chevalier^{a,b,1}, Gilles Millat^{a,c,1}, Eckhard Ficker^{d,1}, Marek Jastrzebski^{e,1}, Hugo Poulin^{f,1}, Valérie Pouliot^{f,1}, Mohamed Chahine^{f,1}, Georges Christé^{a,*,1}

^a Laboratoire de Neurocardiologie, EA4612, Université Lyon 1, Lyon F-69003, France

^b Unité de Rythmologie, Centre National de Référence des Troubles du Rythme d'Origine Héritaire, Hôpital Cardiovasculaire et Pneumologique L. Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69003, France

^c Laboratoire de Cardiogénétique, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69003, France

^d MetroHealth Medical Center, Cleveland, OH, USA

^e Department of Cardiology and Hypertension, University Hospital, Krakow, Poland

^f Le Centre de Recherche en neuroscience, Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec and Department of Medicine, Laval University, Québec, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 November 2013

Available online 12 December 2013

Keywords:

Channelopathy

Long QT syndrome

Human ether-à-go-go related channel

Mutation

Arrhythmias

Sudden death

ABSTRACT

Background: A variant of the ether-à-go-go related channel (*hERG*), *p.Arg148Trp* (*R148W*) was found at heterozygous state in two infants who died from sudden infant death syndrome (SIDS), one with documented prolonged QTc and Torsade de Pointes (TdP), and in an adult woman with QTc > 500 ms, atrioventricular block and TdP. This variant was previously reported in cases of severe ventricular arrhythmia but very rarely in control subjects. Its classification as mutation or polymorphism awaited electrophysiological characterization.

Methods: The properties of this N-terminal, proximal domain, *hERG* variant were explored in *Xenopus* oocytes injected with the same amount of RNA encoding for either *hERG/WT* or *hERG/R148W* or their equimolar mixture. The human ventricular cell (TNNP) model was used to test the effects of changes in *hERG* current.

Results: *R148W* alone produced a current similar to the WT (369 ± 76 nA (mean $\pm$ SEM), $n = 13$ versus 342 ± 55 nA in WT, $n = 13$), while the co-expression of 1/2 WT + 1/2 *R148W* lowered the current by 29% versus WT (243 ± 35 nA, $n = 13$, $p < 0.05$). The voltage dependencies of steady-state activation and inactivation were not changed in the variant alone or in co-expression with the WT. The time constants of fast recovery from inactivation and of fast and slow deactivation analyzed between -120 and $+20$ mV were not changed. The voltage-dependent distribution of the current amplitudes among fast-, slow- and non-deactivating fractions was unaltered. A 6.6% increase in APD90 from 323.5 ms to 345 ms was observed using the human cardiac ventricular myocyte model.

Conclusions: Such a decrease in *hERG* current as evidenced here when co-expressing the *hERG/R148W* variant with the WT may have predisposed to the observed long QT syndrome and associated TdP. Therefore, the heterozygous carriers of *hERG/R148W* may be at risk of cardiac sudden death.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: APD, Action potential duration; APD90, APD at 90% repolarization; DNA, Deoxyribonucleic acid; cDNA, Cyclic DNA; ECG, Electrocardiogram; ESP, Exome Sequencing Project; HEK293, Human-derived renal epithelial cell line number 293; *hERG*, Human ether-à-go-go related gene; IKr, The rapid delayed rectifier current, underlined in cardiac cells by *hERG*; LQTS, Long QT syndrome; PAS domain, Per-Arnt-Sim domain in the N-terminal branch of the *hERG* protein; QT, The QT interval of the ECG; QTc, The corrected QT interval of the ECG, using Bazett's formula; RNA, Ribonucleic acid; mRNA, Messenger RNA; RR, The RR interval of the ECG; SCD, Sudden cardiac death; SDS, Sodium dodecyl-sulfate; SEM, Standard error of the mean; SIDS, Sudden infant death syndrome; SSCP, Single-strand conformational polymorphism; TdP, Torsade de pointes; TNNP, Ten Tusscher, Noble, Noble and Panfilov (2004), mathematical model of a human ventricular action potential; WT, Wild-type.

[☆] Grant support: This study was supported by Université Lyon 1 funding of Unit EA4612 Neurocardiology. This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Quebec (HSFQ), and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MT-13181). G. Christé received travel expenses support for two working stays to M. Chahine's laboratory at Québec from the Centre Jacques Cartier, Université Lyon 3. A. Mechakra and Y. Vincent each are supported by a Thesis Bursary from the MESR, France.

* Corresponding author at: EA4612 Neurocardiologie, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon-Est, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tél: +33 627556373; fax: +33 478777118.

E-mail address: georges.christe@inserm.fr (G. Christé).

¹ This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

1. Introduction

Long QT syndrome (LQTS) is an inherited electrical cardiac disorder characterized by prolongation of ventricular repolarization (Fressart et al., 2010) that involves risk of sudden cardiac death (SCD) from ventricular arrhythmias in a structurally normal heart (Moss et al., 1985). A subset of LQTS (LQT2) is related to mutations in the human ether-à-go-go related gene (*hERG*, *KCNH2*) encoding Kv11.1, the pore forming subunit of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ channel (IKr) (Sanguinetti et al., 1995). To date, about 900 naturally occurring mutations of *hERG* have been identified, including about 190 mutations in the N-terminal domain. The N-terminus of the *hERG* channel is composed of an initial domain (the PAS domain) conserved among all members of the eag family (approximately residues 2–136), and a long stretch of amino acids (up to residue 377) named “*hERG*-specific” or “proximal domain” because of its proximity to the channel core (Warmke and Ganetzky, 1994). About 108 mutations were found in the PAS domain with 16 of them being functionally characterized, whereas only 8 were studied among the 101 mutations found in the proximal domain (The gene connection for the heart, <<http://www.fsm.it/cardmoc/>>, accessed on Sept. 18, 2013) and recent compendia (Kapa et al., 2009; Kapplinger et al., 2009). However, the proximal domain is functionally important in maintaining slow kinetics of activation and deactivation of *hERG* current (Viloria et al., 2000). The variant *R148W*, which is located in this region, causes a significant change from a positively charged amino acid residue to a hydrophobic one.

This particular variant had been qualified as a polymorphism since 4 carriers were found in 2900 control subjects (Kapa et al., 2009). Fressart et al. (2010) reported two additional French families with this *hERG* variant with cardiac ventricular arrhythmias (V. Fressart personal communication) and *R148W* was detected in one out of 44 SCD survivors but not in 1341 controls (Novotny et al., 2011). More recently, the presence and the prevalence of *R148W* were explored in 6500 individuals from the Exome Sequencing Project (ESP) population and genotyped in a control population of 748 individuals (Andreassen et al., 2013). *R148W* was present only in 16 out of 8584 European American but not in 4406 African American individuals of the ESP database. According to the *in-silico* prediction tools, this variant was classified as pathogenic and was absent in the control population. Thus it is currently not clear whether *R148W* represents a rare mutation, a variant modifier or a polymorphism. To our knowledge, no analysis of the influence of this variant on *hERG* current has been reported.

Therefore, we investigated whether the biophysical properties of the *hERG* current expressed in *Xenopus* oocytes would be altered in the presence of the *R148W* variant.

2. Methods

2.1. Mutational analysis

Genotyping analysis was performed as formerly described (Millat et al., 2006). Previously reported primer pairs were used to amplify all exons of *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, and *SCN5A* from the genomic DNA. All exons were screened for the presence of nucleotide sequence polymorphisms by single-strand conformational polymorphism (SSCP). Informed consent was obtained from each subject of this exploration.

2.2. Engineering of mutant plasmid cDNA

The single base pair variant *hERG*/c.442C>T was introduced into a *hERG* cDNA in *pcDNA3* expression vector (kindly provided by G. Robertson) using a QuickChange site-directed mutagenesis kit according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, California), using the following nucleotide mutagenic sense and antisense primers: *hERG*-c.442T/F (catgacaccaaccactggggcccccaccagc) and *hERG*-c.442T/R

(gctgggtggggggcccccagtggtgtgtcatg), the underlined is the mutation site. The mutated sites were confirmed by automatic sequencing.

2.3. Expression and electrophysiological studies

Xenopus oocytes were prepared as previously described (Chahine et al., 1992). Briefly, oocytes were subjected to collagenase treatment at 2 mg/ml during 2.5 to 3 h, stage V or VI oocytes were microinjected with 5 ng capped mRNA encoding either wild-type *hERG* (*hERG*/WT) or variant *hERG*. In a third group of oocytes, 2.5 ng of *hERG*/WT mRNA was co-injected with 2.5 ng of variant *hERG* mRNA in order to reproduce the heterozygous condition present in the patients carrying the *hERG* variant. Oocytes were maintained at 18 °C in a 2-fold diluted solution of Leibovitz L-15 medium (Gibco, Grand Island, New York) enriched with 15 mM HEPES (pH 7.6, adjusted with NaOH), 1 mM glutamine, and 50 µg/µl gentamycin. Oocytes were used for the experiments at days 3 and 4 after injection. Each experimental day, we explored in a row, one oocyte from the WT group, one from the variant group and one from the co-expression group and repeated this pattern, so that an equal number of oocytes from each group were measured at similar times after transfection. The macroscopic potassium currents from the mRNA-microinjected oocytes were recorded using the voltage-clamp technique with two microelectrodes filled with a three-molar potassium chloride solution. Membrane potential was controlled by a Warner oocyte clamp (Warner Instrument Corp., Hamden, Connecticut). Voltage commands were generated by computer using pCLAMP software version 5.5 (Axon Instruments). Currents were filtered at 1/3 of the sampling frequency (−3 dB; 4-pole Bessel filter). The Ringer bathing solution contained (mM): 116 NaCl, 2 KCl, 0.9 CaCl₂, and 2.9 MgCl₂, 5 HEPES; pH was adjusted to 7.6 at 22 °C with NaOH. The Ringer solution was low in Ca²⁺ to reduce the contribution of Ca²⁺-activated chloride currents. All experiments were carried out at room temperature (22 °C).

2.4. Western blot analysis

As previously described, the polyclonal anti-*hERG* antibody, rabbit *hERG* 519, was used to analyze *hERG* expression in HEK293 cells (Ficker et al., 2003). Using Eugene 6, cells were transiently transfected with either 1 µg of WT or 1 µg *R148W* cDNA or a mixture of 0.5 µg of each cDNA. Two days later, transfected cells were solubilized for 1 h at 4 °C in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% Triton X-100, and protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics). Protein concentrations were determined by the BCA method (Pierce, Rockford, Illinois). Proteins were separated on SDS polyacrylamide gels, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and developed using *hERG* 519 antibody followed by ECL Plus (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey). Densities of the relevant spots were measured and normalized versus that of the corresponding spot in the WT. These normalized densities were averaged from 3 separate experiments.

2.5. Evaluation of the functional characteristics of *hERG* currents

For each oocyte, the membrane capacitance current was evaluated by computing the integral of the current in response to a 10 mV depolarizing test pulse of 10 ms duration from a holding voltage at −80 mV.

Voltage-clamp protocols are identical to those previously described (Christé et al., 2008; Lin et al., 2008).

The voltage dependence of activation and the apparent rectification at steady state, were evaluated using methods previously reported in details (Lin et al., 2008). A classical two-pulse voltage-clamp protocol was used. From a holding potential of −80 mV, the first test pulse (P1) with variable voltages was applied (from −80 mV to +60 mV with an increment of 10 mV) followed by the second pulse (P2) to −60 mV. Values of the current at the end of the first pulse (*I*_{endP1}) and peak

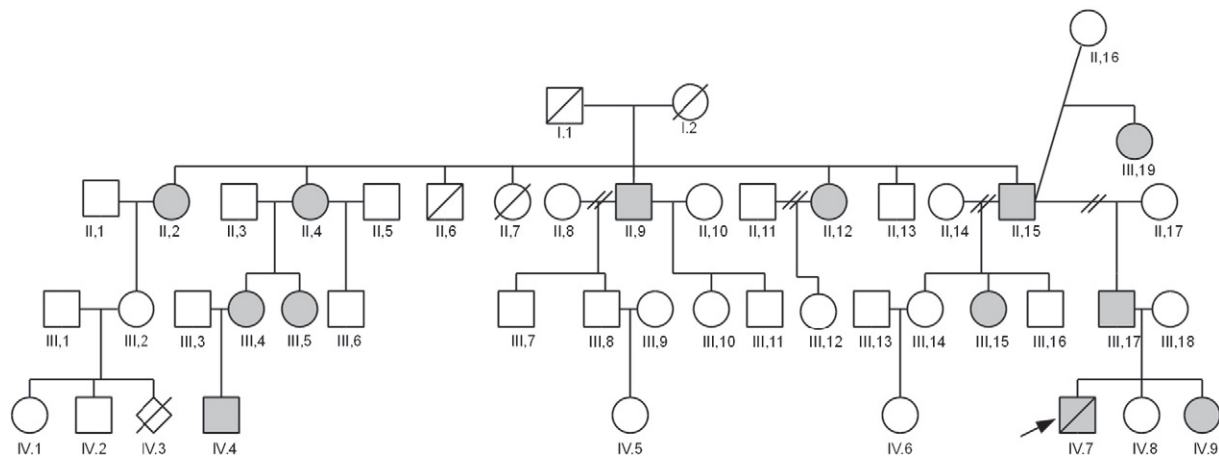
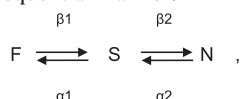


Fig. 1. Pedigree of the family. The arrow denotes the proband, an infant who died while asleep. Men are represented by squares and women by circles. The lozenge labeled IV.4 denotes a fetus that died intra uterine. A slash over a symbol denotes deceased individual, gray symbols denote carriers of the *R148W* variant, white symbols denote either non-carriers or not determined (see Table 1). Double slashes denote divorced or separated couples. For clarity, individuals are given numbers, the roman part of which stands for the generation and the Latin one for the rank in our database. Further details are presented in Table 1.

current values during pulse P2 ($I_{peak}P2$) were gathered at all voltages and simultaneously fitted by a sum of two voltage-dependent functions describing: i) the *hERG* current, taking into account the reversal voltage, the fully activated maximal conductance and the steady-state rectification and activation variables versus voltage; and ii) the endogenous oocyte current as described in Lin et al. (2008).

The voltage dependence of the time constant of inactivation was evaluated using a classical three-pulse voltage-clamp protocol as described (Christé et al., 2008).

The kinetics of deactivation were described using a mathematical model mimicking three subpopulations of channels having different properties of deactivation, as previously described (Christé et al., 2008). Channels are distributed among three fractions: channels that deactivate rapidly (F), channels that deactivate slowly (S) and channels that do not deactivate at all (N). Channels moved from one subpopulation to the other in a sequential manner:



where α_1 , β_1 , α_2 and β_2 are the rate constants of interconversion, that are functions of voltage.

2.6. Data analysis and statistics

Analysis of electrophysiological data was done using macros in CLAMPFIT (pCLAMP v6.0, Axon Instruments) and custom programs written under MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts). Statistical tests and final figures were prepared using Origin (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts). The results are expressed in text and graphs as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The number of measurements (n) is indicated in parentheses. For each figure, black squares represent WT, red circles represent *R148W* and green triangles represent the co-injection of WT + *R148W*.

2.7. Human cardiac ventricular myocyte computer modeling

The CellML version a of the human ventricular myocyte model of Ten Tusscher, Noble, Noble and Panfilov (ten Tusscher et al., 2004) (TNNP model) was run under Windows XP using Cellular Open Resource (COR v 0.9.31.1409, by Dr. Alan GARNY). Action potentials were produced at 1 Hz stimulation for at least 10 min of cell lifetime, so

that all variables reached a dynamic steady state. APD90 was measured between AP upstroke and 90% repolarisation from the initial plateau amplitude.

3. Results

3.1. Clinical background

The *hERG/R148W* variant was found in 3 separate patients:

- 1) A young child aged 13 months, who died suddenly during sleep. The variant was also found in several family members, a few of which have a prolonged corrected QT interval (QTc, corrected to 60 bpm reference heart rate using Bazett's formula, i.e. $QTc = QT/\sqrt{RR}$, with RR in seconds) on the electrocardiogram (see family pedigree in Fig. 1 and clinical data in Table 1). The average QTc of the 8 carriers of the variant was 429 ± 8 ms. Although this is lower than the usual limit of 440 ms for suspicion of long QT, mutation carriers III:5 and III:15, however, had QTc

Table 1

The available genetic and clinical data concerning family members as depicted in the pedigree in Fig. 1.

Number	Born	Carrier (<i>hERG/R148W</i>)	QTc value (ms)
II:2	1940	Carrier	n.a.
II:4	1941	Carrier	420
II:9	1946	Carrier	n.a.
II:12	1951	Carrier	n.a.
II:15	1944	Heterozygous carrier (2 $\times$)	n.a.
II:17	1948	Non carrier	400
III:4	1972	Carrier	419
III:5	1981	Carrier	450
III:12	1984	Not determined	425
III:15	1966	Carrier	470
III:17	1973	Heterozygous carrier (2 $\times$)	<405
III:18	1973	Non-carrier (2 $\times$)	440
III:19	2003	Heterozygous carrier (2 $\times$)	420 (QT = 374 ms)
IV:4	2006	Carrier	440
IV:7	2003	Heterozygous carrier*	n.a.
IV:8	2007	Non carrier (2 $\times$)	300
IV:9	2009	Heterozygous carrier (1 $\times$)	380–440

*Individual IV:7 (in bold) is the proband who died in December 2004 from SIDS while asleep, n.a.: not available.

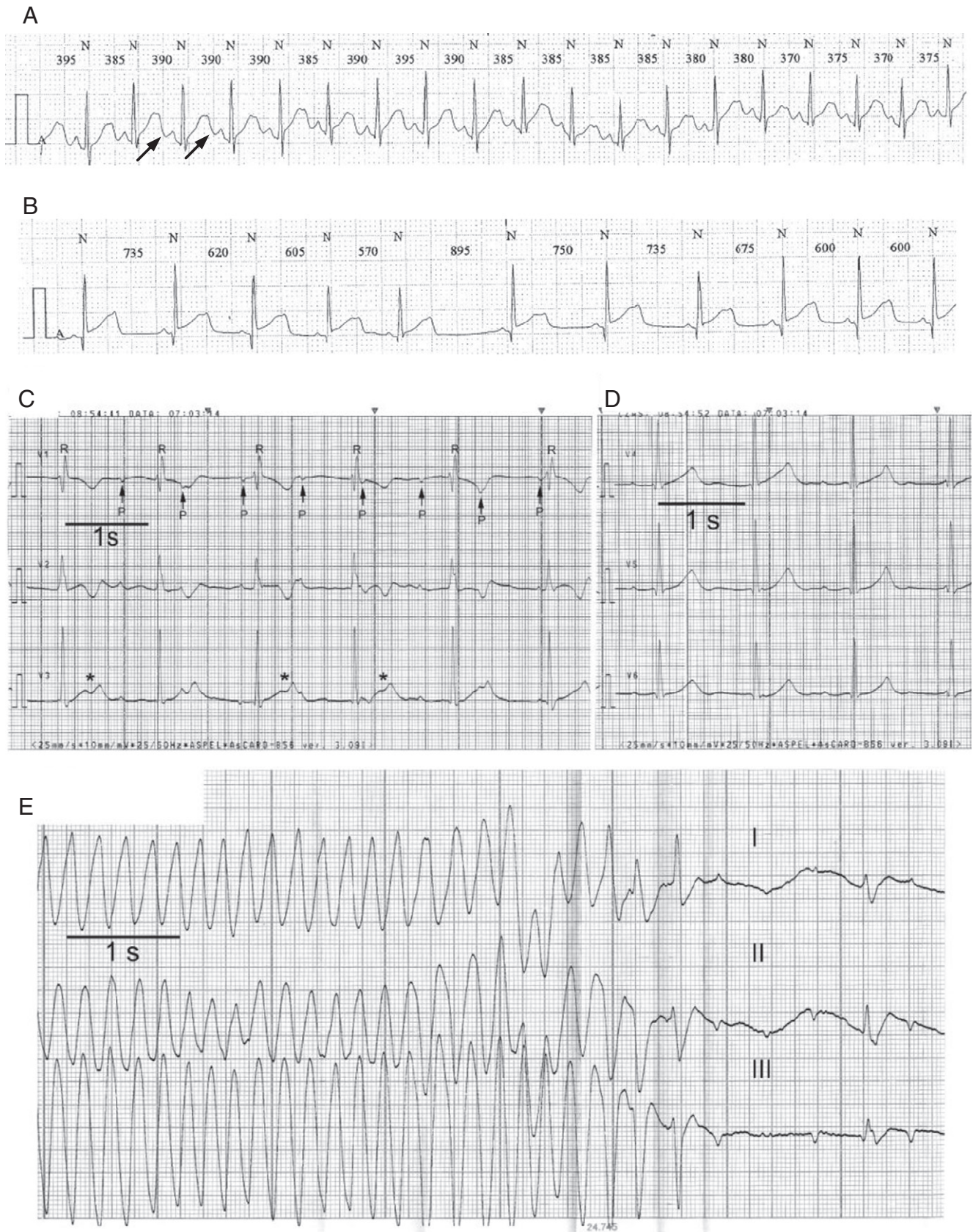


Fig. 2. ECG evidence for TdP in the Polish patient. A and B: Extracts from a Holter recording of mutation carrier IV:9, from the family in Fig. 1, taken at high (A) and at low (B) heart rates, showing split T waves, more conspicuous at low heart rates. Incomplete adaptation of QT interval at high rate is revealed by P wave occurring before completion of T wave (arrows in A). C and D: ECG recording at rest. C: Leads V1 to V3, D: Leads V4 to V6. In C, note the third degree AV block with a regular PP interval at 0.72 s (P waves denoted by arrows and P), a regular RR interval at 1.16 s (R symbols), and a QT duration of 430 ms (QTc of 400 ms). Split T waves in V3 lead are denoted by * when unambiguous. E: Polymorphic ventricular tachycardia episode recorded in the same patient.

values of 450 and 470 ms, respectively. Interestingly, Holter recordings taken in another relative (number IV:9) (Figs. 2A and B) show, at high heart rates, a weak accommodation of QT length, the P wave starting before complete return of the T wave to baseline (arrows in Fig. 2A). The average QTc value at high heart rate of 157 bpm (Fig. 2A) was 435 ± 4 ms ($n = 14$) whereas it was 382 ± 8 ms ($n = 8$) at low beat rate of 87 bpm (Fig. 2B), confirming the lack of adaptation of QTc to high rate. In addition, the T wave presents with a flat dome at high rate that evolves into a partial split aspect at low rate. No pathogenic mutations were identified in the *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2* and *SCN5A* genes of the proband.

- 2) A male SIDS case, together with other non-synonymous polymorphisms: *hERG/K897T*, *SCN5A/R34C*, *SCN5A/H558R*, and *KCNE1/G38S*. The *R148W* variant was also present in his father who displayed a normal ECG (Millat et al., 2009).
- 3) A Polish woman who had degree III atrioventricular block and bradycardia-related QT prolongation with polymorph ventricular tachycardia (see ECG recordings in Figs. 2C, D and E) that resulted in SCD aborted by defibrillation. Of note is the presence of split T waves (Fig. 2C). This patient was implanted with a dual chamber pacemaker and remains stable without any further arrhythmic or syncope episodes. No pathogenic genomic variation was identified in *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2* or *SCN5A*. There was no familial history of SCD.

3.2. Mutation structure

The *p.Arg148Trp* variant (*R148W*) corresponds to the substitution of cytosine 442 by a thymine (*c.442C>T*) (Fig. 3A) which replaces the

conserved arginine residue in position 148 by a tryptophan. This missense variant was not identified in 400 normal chromosomes.

This variant is reported as germline by NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) under rs139544114 but absent from 1000-Genomes (<http://www.1000genomes.org/>) and LOVD (<http://www.genomed.org>) databases. It is evaluated as benign by MutationTaster (<http://mutationtaster.org>) but deleterious by SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and as “probably damaging” by Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Exome Variant Server (EVS: <http://evs.gs.washington.edu/EVS>) reports its presence in 16 out of 8584 European American controls but not in 4406 African Americans.

The Western analysis of the *R148W* protein (Fig. 3B) showed the presence of core glycosylated and fully glycosylated (fg) forms. A densitometry analysis of the fg bands showed that the amounts of the fully glycosylated, cell surface form, of hERG following either transfection with 1 μ g *hERG/R148W* cDNA, or co-transfection with 0.5 μ g *hERG/R148W* cDNA and 0.5 μ g *hERG/WT* cDNA did not differ from that after transfection with 1 μ g *hERG/WT* (Fig. 3C).

3.3. Properties of hERG/R148W variant channels

Measurements of characteristics of the hERG current included: current amplitude, activation time constant, and voltage dependence of steady-state activation and of apparent rectification. In our experiments, we used a double-pulse voltage-clamp protocol (see inset to Fig. 4), and current traces (see examples in Fig. 4) were analyzed as described in the Methods. The amplitude of current at the end of pulse P1 versus voltage yielded a bell-shaped curve characteristic of hERG currents (Fig. 4E). The *R148W* variant, expressed alone or co-expressed with the WT, did not produce any kinetic modification. The amplitude of the current at the end of pulse P1 (I_{endP1} in Fig. 4E), was lower in cells co-expressing both plasmids than in cells expressing either WT or *R148W* plasmids alone, but not significantly.

Peak current amplitudes during the second test pulse (Fig. 4F) account for the degree of activation due to pulse P1. Again, the *R148W* variant developed currents similar to WT (369 ± 76 nA, $n = 13$ versus 342 ± 55 nA, $n = 12$ for the WT). However, on co-expression with WT, the *R148W* variant led to a significant current decrease (about 29%) at membrane voltages above -20 mV where the current is maximally activated (243 ± 35 nA, $n = 13$ versus 342 ± 55 nA, $n = 12$ for the WT).

It is usual to normalize current magnitudes to cell membrane capacitance. Cell capacitance measurements (see Methods) yielded values that were quite homogeneous from one egg to another and differed slightly among the three groups of cells used for the measurements: the mean $\pm$ sd (SEM) were: 26.3 ± 2.7 (0.8) pF for WT ($n = 12$); 23.8 ± 2.0 (0.6) pF for *R148W* ($n = 13$); 24.3 ± 3.2 (0.9) pF for *R148W* + WT ($n = 13$). The relative statistical dispersion of the current amplitudes was computed as the ratio of the SEM to the mean for each series, before and after normalization to cell capacitance. It was decreased from 0.21 to 0.19 for *R148W* but increased from 0.16 to 0.175 for the WT and from 0.14 to 0.16 for *R148W* + WT. If whole-cell current would be related to egg cell capacitance, one would expect that normalization would appreciably decrease the relative dispersion of each data series. Here we observe a slight decrease for *R148W*, but an increase for the two other data series. Thus, a putative link of current magnitudes to C_m did not account for cell-to-cell dispersion of current magnitudes. Therefore we reported the whole-cell current values.

When current traces recorded during pulse P1 were fitted with an exponential function to evaluate the time constant of activation (Fig. 4G), the *R148W* variant had no effect either alone or on co-expression with WT. The voltage dependencies of steady-state activation and apparent rectification were identical in the three expression conditions (Fig. 4H).

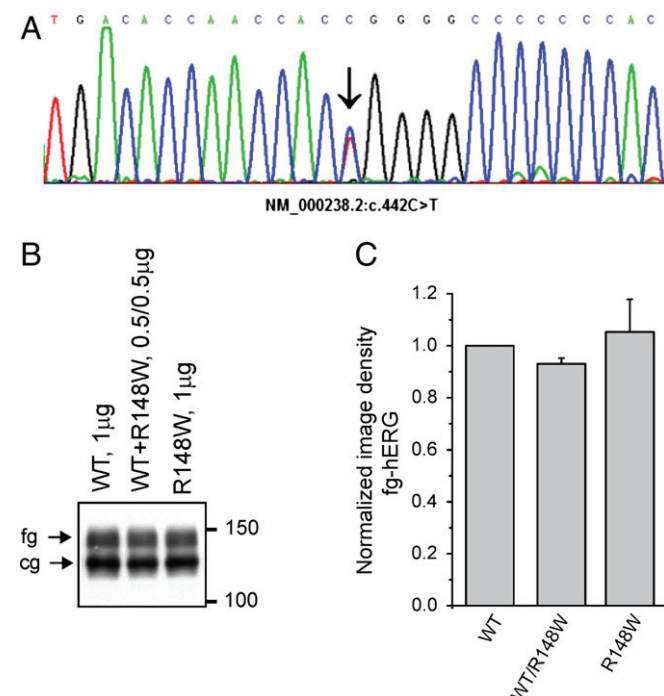


Fig. 3. Identification and in vitro expression of the mutants. A: Chromatogram showing the single point variation C>T found at position 442 in the nucleotide sequence of the *hERG* gene (arrow). B: Example of a Western blot analysis of *hERG* proteins in HEK293 cells. Note the presence of the core-glycosylated form (cg) and of the fully glycosylated form (fg) in protein extracts from cells transfected with 1 μ g of the *WT/hERG* cDNA (left lane), or with 1 μ g of the mutant cDNA (right lane) or their equimolar mixture (0.5 μ g of each, middle lane). C: Quantitative analysis of the Western blots in B. Densities of the fg spots for each of the three lanes were normalized to that of the WT lane. The bar graph reports mean $\pm$ SEM values of the relative densities of the fg spots from 3 separate experiments.

3.4. Analysis of deactivation kinetics of the hERG current

After hERG current was activated with a conditioning pulse of 2 s duration at +40 mV, we applied a test pulse at voltages from −120 mV to +20 mV in +10 mV increments (Fig. 5A). This deactivating pulse lasted 8 s. Current traces recorded during this second pulse were fitted with a sum of three exponential functions plus a constant:

$$y = I_{\text{recov.inact}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{recov.inact}}) + I_{\text{fast}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + I_{\text{slow}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + I_{\text{inf}}$$

In this analysis, the first exponential corresponds to recovery from inactivation (complete within 10 to 50 ms) which is followed by current deactivation composed of a fast and a slow phase. The I_{inf} constant corresponds to the current through channels that do not deactivate.

We explored the effect of R148W on the fractions of the current available (after recovery from inactivation) at the beginning of pulse P2 which will eventually undergo either fast or slow deactivation or which will not deactivate at all (Fig. 5B). Firstly, we extracted from the results of the fit, the initial amplitude of the fast (I_{fast})

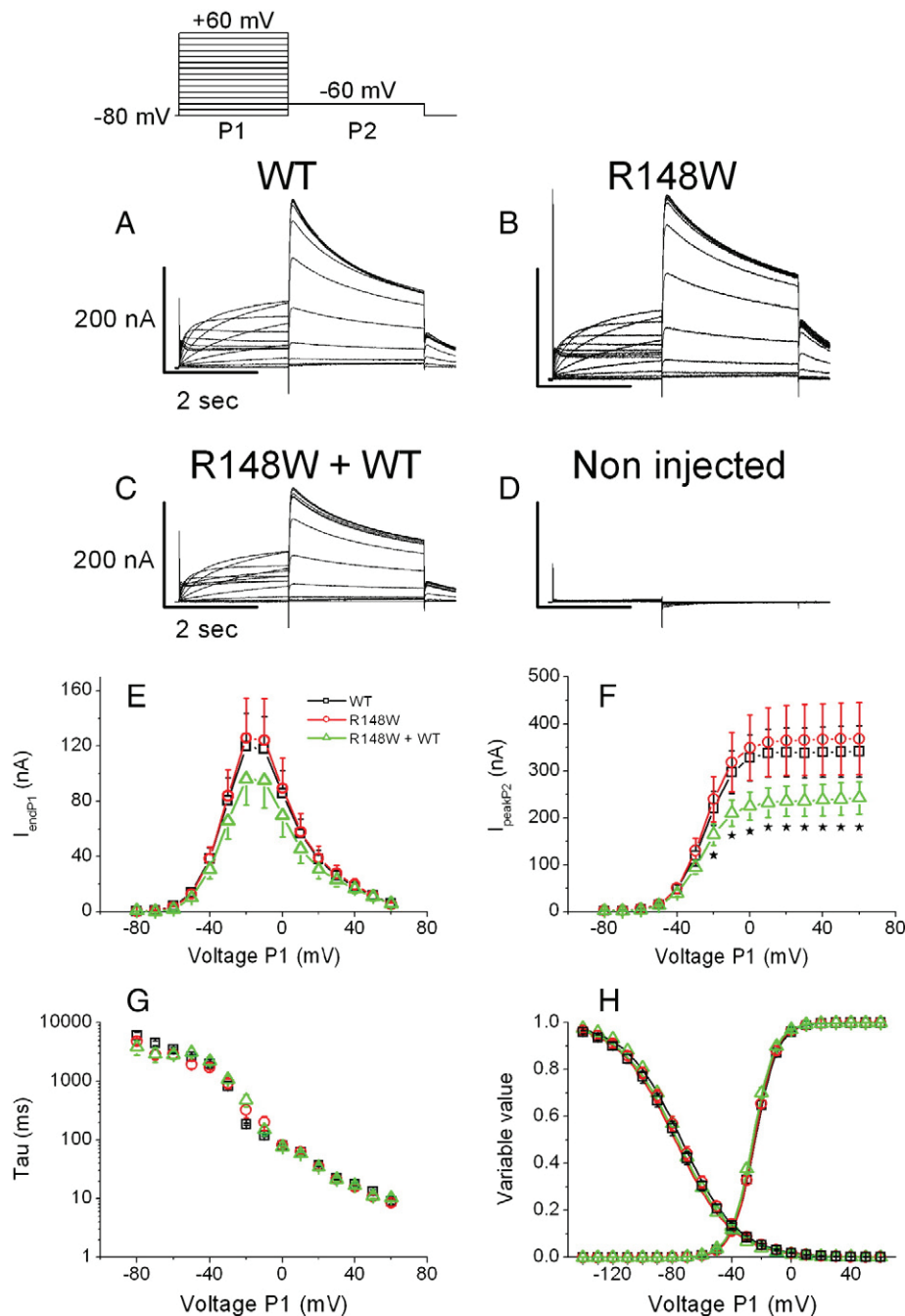


Fig. 4. Representative recordings of currents from *Xenopus* oocytes injected with 5 ng hERG/WT mRNA (A), 5 ng hERG/R148W mRNA (B), a mixture of 2.5 ng WT and 2.5 ng R148W mRNAs (C) or injected with water alone (D). The upper panel illustrates the voltage-clamp protocol used. Sampling frequency was 1 kHz. The current amplitudes measured at the end of pulse P1 (I_{endP1}) or at the peak of current during pulse P2 (I_{peakP2}) were corrected from endogenous current (see Methods) and plotted versus voltage of pulse P1 in panels E and F respectively. In panel F, symbols (*) denote significant difference ($p < 0.05$) in average current amplitudes between oocytes co-injected with WT and R148W hERG and those injected with WT alone. G: Time constant of activation versus voltage as evaluated from fitting an exponential function to the time course of current during pulse P1. H: Plots of the steady-state activation and apparent rectification variables recalculated using the parameter values as derived from the ensemble fit of I_{endP1} and I_{peakP2} currents versus voltage data (see Methods and (Lin et al., 2008)). ($n = 13$ –21).

and slow (I_{slow}) exponentials and the infinite time value of the function (I_{inf}) for each voltage for every oocyte (see an example of the results of this analysis in Fig. 5B). The ratio of these values to the sum of I_{fast} , I_{slow} and I_{inf} served to evaluate the fraction of each deactivation component. Then we computed, for each series of injected oocytes, for each component of deactivation and for each voltage, the mean fractions, which were plotted versus voltage in Fig. 5C. Note that the distribution among the three components is not significantly influenced by *R148W*. In addition, the *R148W* variant, alone or on co-expression with WT, did neither alter the fast (τ_{fast}) nor the slow (τ_{slow}) deactivation time constant when compared to WT (Figs. 5E and F).

3.5. Analysis of *R148W* effects on inactivation kinetics

A three-pulse voltage-clamp protocol was used. From a holding voltage of -80 mV, the first pulse of 2 s duration to $+50$ mV was used to cause maximal channel activation, followed by a 24 ms conditioning pulse to -160 mV to largely relieve inactivation. The third pulse followed immediately, to voltages between -80 and $+50$ mV in 20 mV increments, to elicit inactivating hERG currents. The time course of decay of the current recorded during this third pulse was fitted with a single exponential function in order to measure the time constant of inactivation. These values have been plotted versus voltage in Fig. 5D, together with the time constants of recovery from inactivation as evaluated during the analysis of deactivation kinetics (see above). Again, there was no difference between WT and *R148W* either expressed alone or co-expressed with WT (Fig. 5D).

4. Discussion

4.1. Functional correlates

According to a study by Kapplinger et al. (2009), screening of 2500 LQTS patients showed that 21% of mutations were found in the proximal domain of hERG. However, up to now, only 8 of these 101 mutations were characterized electrophysiologically while 16 of the 108 mutations in the nearby PAS domain were studied. Thus, variants in the proximal domain are not well characterized due to a perceived increased pathogenicity of mutations in the PAS domain (Kapa et al., 2009). In contrast, Vilorio et al. (2000) found that suppression of the proximal domain induced a dramatic acceleration of channel activation accompanied by a shift of steady-state activation towards hyperpolarized voltages. In fact, it has been suggested that the entire proximal domain is involved in the modulation of hERG gating (Kapa et al., 2009). Indeed, selectively removing the proximal domain causes an acceleration of forward transitions towards channel opening (Gomez-Varela et al., 2002). This may be due to a particular distribution of charged amino acid residues in the proximal domain which modulates activation gating (Saenen et al., 2006).

The lack of any kinetic changes in hERG current recorded from oocytes injected with either *R148W* alone or together with the WT, suggests that this residue does not interfere with hERG gating despite the fact that residue 148 is localized within a segment of the protein (residues 143–172), the deletion of which causes a positive shift in steady-state activation (Saenen et al., 2006). In other words, the transition at position 148 from a residue with a strongly basic side chain (arginine) to a residue with an aromatic side chain (tryptophan) might not alter the molecular interaction of the proximal domain with the core region of the channel.

In contrast, Fodstad et al. (2006) showed that *hERG/R176W*, which achieves an identical substitution at a location 28 residues further in the proximal domain, decreased current density, which they have attributed to a combination of defective trafficking and acceleration of deactivation kinetics. In the present study, however, expression of

R148W alone did not decrease current amplitude when compared to WT expressed alone. The variant *R148W* is unlikely to cause trafficking defect of hERG (Fig. 3B), since the amount of fully glycosylated protein (fg) was not significantly altered by the mutant either expressed alone or co-expressed with the WT (Fig. 3C).

Mutants of hERG located in other regions of the channel have been found to traffic normally to the membrane but show lower current density without changes in kinetics. In particular it has been shown that N633D is core- and fully glycosylated, traffics normally to the membrane and is co-assembling correctly with WT hERG. Yet the whole-cell current shows reduced conductance (Hsueh et al., 2008). The same group showed that the C-terminal truncated P923fsX51 protein displays normal trafficking and co-assembles into tetramers with the WT hERG but carries a current reduced by 34%. The G628S mutated hERG protein traffics normally to the membrane (Anderson et al., 2006; Zhou et al., 1998) but carries less current when co-expressed with the WT without changes in current kinetics (Sanguinetti et al., 1996). Mutation R744P displays the same pattern (Aidery et al., 2012), as well as R328C (Anderson et al., 2006; Chevalier et al., 2001). Similarly to these mutations, *R148W* appears to cause a class 4 mechanism of hERG channel dysfunction (Delisle et al., 2004).

Because the hERG channel consists of a tetramer of α subunits, the reduction in current might be explained if all homo- and heterotetramers would traffic to the cell surface but a subset of heterotetramers of mutant and WT subunits in certain configuration(s) would lead to non-functional channels. Among all possible tetramers (January et al., 2000), three of the heterotetrameric forms each represents 25% of all channels. Such a fraction of current loss would be consistent with the 29% lower current observed here in co-expression experiments.

4.2. Is hERG/R148W a polymorphism or a mutation?

The *hERG/R148W* variant was reported in four previous studies. Tan et al. (2006) reported *R148W* first in a patient with LQT and TdP. However, the patient carried an additional variant *hERG/F98S*. *hERG/R148W* was classified as a polymorphism by Kapa et al. (2009) who reported it in 4 out of 1369 controls. Furthermore, *R148W* was found in 4 families with long QT and TdP or SIDS but not in 100 controls by Fressart et al. (2010). Novotny et al. found *R148W* in one of 45 ventricular fibrillation survivors with coronary artery disease but neither in 90 matched healthy controls, nor in 141 matched patients with coronary artery disease that did not show malignant arrhythmias (Novotny et al., 2011). In the present study it was not found in 400 control chromosomes. Fressart et al. pointed out that the *R148W* variant of hERG has characteristics of both a polymorphism and a mutation and that analysis of family segregation did not disclose the true nature of this variant (Fressart et al., 2010). Thus, *R148W* can be considered at the same time a rare polymorphism and a pathogenic mutation. We found the *R148W* variant in a proband who died suddenly from SIDS and in 12 other members of his family of which four have a QTc value ≥ 440 ms. Besides, figures of split T waves were seen on the ECG in two carriers of the mutation (Fig. 2): in a relative of case 1 and in case 3, and abnormal adaptation of QTc interval to high heart rate was seen in a relative of case 1 (Fig. 2A), which is a sign associated with LQTS (Aziz et al., 2011). Most carriers of the *R148W* variant are asymptomatic and do not show a prolongation of the QTc. In families carrying *R148W*, long QTc and syncope segregate usually with the mutation (this data and personal communication from V. Fressart et al.). However, at least one homozygous carrier was also asymptomatic (V. Fressart et al. personal communication), which agrees with the lack of effect of *R148W* on the amplitude and kinetics of the currents when expressed alone in *Xenopus*

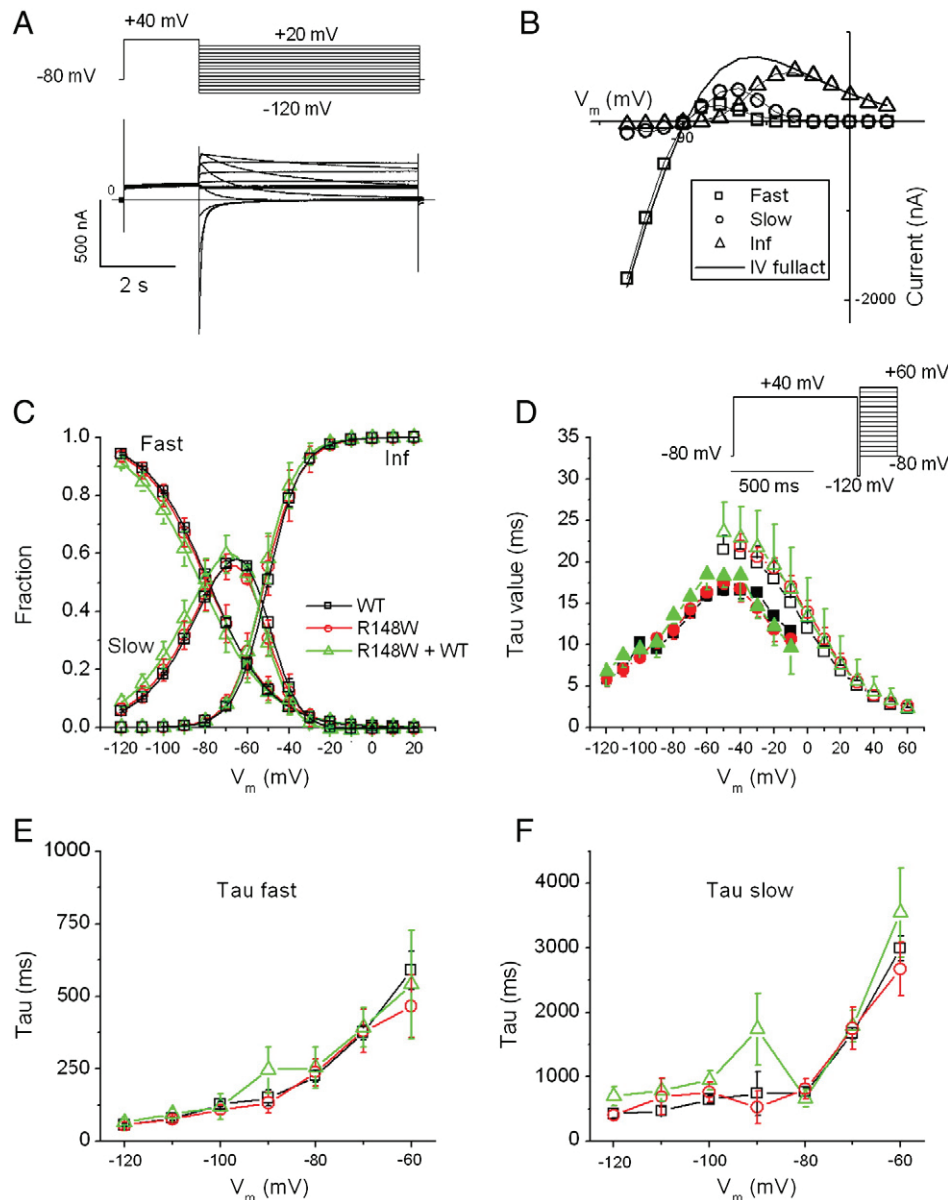


Fig. 5. Deactivation and inactivation properties of the variant hERG current. A: Example of currents recorded in response to voltage-clamp protocols to show that voltage escape was merely absent. B: An example of analysis in one oocyte of the amplitudes of the three components of deactivation at each voltage: the fast one (squares), the slow one (circles) and the non-decaying one (triangles). Their sum recapitulates the fully activated current-voltage curve, i.e., the value of the current during pulse 2 extrapolated to time zero in the absence of the initial rapid recovery from inactivation. C: The fraction of current decaying fast (F_{fast}), slowly (F_{slow}) and the fraction of non-decaying current (F_{inf}) were plotted versus voltage ($n = 3-6$). D: Time constant of inactivation versus voltage (open symbols), as evaluated from a 3-pulse protocol as previously described (shown in the inset) (Christé et al., 2008), plotted together with the time constant of recovery from inactivation (filled symbols), as evaluated from the initial very fast component in the analysis of the time course of current during pulse 2 of the protocol in A, in 5 to 8 *Xenopus* oocytes. The time constants of fast (τ_{fast}) and slow (τ_{slow}) deactivation were evaluated (see Methods) and respectively plotted in panels E and F versus second pulse command voltage.

oocytes. However, following co-expression with WT (heterozygous condition), *R148W* decreased whole-cell current density by 29%.

When this change was introduced into the TNNP model of the human cardiac ventricular action potential (see in Methods) stabilized at 1 Hz stimulation, it caused a 6.6% increase in APD from 323.5 ms to 345 ms as shown in Fig. 6.

These results may, in part, explain the prolongation of the QTc interval observed in patients heterozygous for *R148W*, and could also explain the predisposition of newborn carriers to TdP and to sudden cardiac death. However the moderate decrease in hERG current density and increase in AP duration as seen in the cardiac cell model are in line with the fact that not all carriers of the variant are symptomatic. Therefore, additional factors are likely to contribute to the diseased state.

4.3. Study limitations

Extrapolating the present results to the cardiac cells in the carriers of the mutation faces several limitations. The kinetic properties of the hERG channels have been explored at room temperature and found unaltered by the mutation. The possibility that this may not hold at a physiological temperature of 37 °C in a mammalian cell line has not been tested. Neither did we explore the influence of the mutation at even higher temperatures (fever) or under acidosis, conditions that may occur in infants subjected to SIDS. The hERG channel as expressed here differs from the functional IKr channel as within a human cardiac cell, since interacting molecules such as KCNE2 (MiRP1) (Abbott et al., 1999; Weerapura et al., 2002), KCNE1 (MinK) (McDonald et al., 1997;

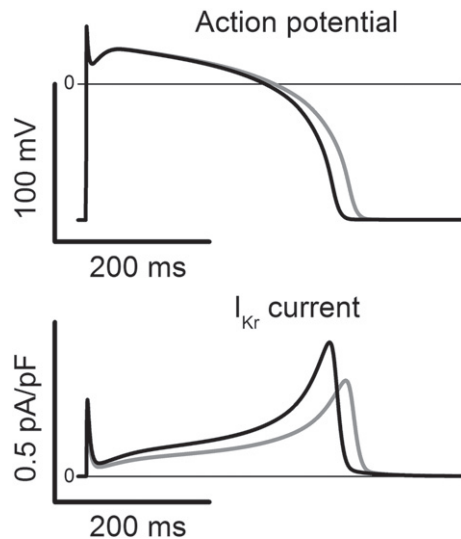


Fig. 6. Change of the human action potential duration (upper panel) and the hERG current (lower panel) when the hERG conductance was reduced by 29% (gray line) versus the control conditions (black line), as predicted by the used model of the human ventricular myocyte (see *Methods*); stimulation at 1 Hz.

Um and McDonald, 2007) or KCNQ1 (Guo et al., 2011), that interfere with hERG properties or protein life time, were absent. In spite of these limitations, the present work shows that the *R148W* mutation of *hERG* interferes with the *WT* hERG in co-expression conditions so that the hERG current is significantly decreased, and that a trafficking deficiency is unlikely.

5. Conclusion

Although representing a significant change in chemical properties of the amino acid residue side chain, the variant *hERG/R148W* altered neither the kinetic properties of the hERG channel expressed in *Xenopus* oocytes nor the trafficking, as tested in a mammalian cell line. However, when co-expressed with the *WT*, it caused a 29% reduction in the hERG current, that, if present in ventricular cells of a human carrier, could partly explain QTc prolongation, and may have predisposed to TdP, syncope and SIDS found in some *hERG/R148W* carriers. Therefore, this variant might be more than a benign polymorphism.

Conflicts of interest statement

None of the authors has any actual or potential conflict of interest to declare.

Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the participants for their devotion to the study. The authors thank Pr. Patrice BOUVAGNET, Birol YAZAR and Julie SEBASTIAN for their help in collecting family data.

References

Abbott, G.W., et al., 1999. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97, 175–187.

- Aidery, P., et al., 2012. Identification and functional characterization of the novel human ether-a-go-go-related gene (hERG)R744P mutant associated with hereditary long QT syndrome 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 830–835.
- Anderson, C.L., et al., 2006. Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation* 113, 365–373.
- Andreasen, C., et al., 2013. Mutations in genes encoding cardiac ion channels previously associated with sudden infant death syndrome (SIDS) are present with high frequency in new exome data. *Can. J. Cardiol.* 29, 1104–1109.
- Aziz, P.F., et al., 2011. Genotype- and mutation site-specific QT adaptation during exercise, recovery, and postural changes in children with long-QT syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4, 867–873.
- Chahine, M., et al., 1992. Lidocaine block of human heart sodium channels expressed in *xenopus* oocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 1231–1236.
- Chevalier, P., et al., 2001. Non-invasive testing of acquired long QT syndrome: evidence for multiple arrhythmogenic substrates. *Cardiovasc. Res.* 50, 386–398.
- Christé, G., et al., 2008. A new C-terminal HERG mutation A915fs + 47X associated with symptomatic LQT2 and auditory-trigger syncope. *Heart Rhythm* 5, 1577–1586.
- Delisle, B.P., et al., 2004. Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ. Res.* 94, 1418–1428.
- Ficker, E., et al., 2003. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ. Res.* 92, e87–e100.
- Fodstad, H., et al., 2006. Molecular characterization of two founder mutations causing long QT syndrome and identification of compound heterozygous patients. *Ann. Med.* 38, 294–304.
- Fressart, V., et al., 2010. A propos de deux variants R148W et R176W de KCNH2: mutations responsables de syndrome de QT long ou polymorphismes rares. *Med. Sci.* 26–1, P326.
- Gomez-Varela, D., et al., 2002. Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open states in human erg K⁺ channels. *J. Membr. Biol.* 187, 117–133.
- Guo, J., et al., 2011. Interaction between the cardiac rapidly (IKr) and slowly (IKs) activating delayed rectifier potassium channels revealed by low K⁺-induced hERG endocytic degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 34664–34674.
- Hsueh, C.H., et al., 2008. Functional studies on three novel KCNH2 mutations in Taiwan: Identification of distinct mechanisms of channel defect and dissociation between glycosylation defect and assembly defect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 572–578.
- January, C.T., Gong, Q., Zhou, Z., 2000. Long QT syndrome: cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 11, 1413–1418.
- Kapa, S., et al., 2009. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 120, 1752–1760.
- Kaplinger, J.D., et al., 2009. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297–1303.
- Lin, M.T., et al., 2008. In utero onset of long QT syndrome with atrioventricular block and spontaneous or lidocaine-induced ventricular tachycardia: compound effects of hERG pore-region mutation and SCN5A N-terminus variant. *Heart Rhythm* 5, 1567–1574.
- McDonald, T.V., et al., 1997. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current (IKr). *Nature* 388, 289–292.
- Millat, G., et al., 2006. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin. Genet.* 70, 214–227.
- Millat, G., et al., 2009. Contribution of long-QT syndrome genetic variants in sudden infant death syndrome. *Pediatr. Cardiol.* 30, 502–509.
- Moss, A.J., et al., 1985. The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation* 71, 17–21.
- Novotny, T., et al., 2011. Mutation analysis ion channel genes ventricular fibrillation survivors with coronary artery Disease. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 10–8159.
- Saenen, J.B., et al., 2006. Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain. *Biophys. J.* 91, 4381–4391.
- Sanguinetti, M.C., et al., 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81, 299–307.
- Sanguinetti, M.C., et al., 1996. Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2208–2212.
- Tan, H.L., et al., 2006. Genotype-specific onset of arrhythmias in congenital long-QT syndrome. Possible therapy implications. *Circulation* 114, 2096–2103.
- ten Tusscher, K.H., et al., 2004. A model for human ventricular tissue. *Am. J. Physiol.* 286, H1573–H1589.
- Um, S.Y., McDonald, T.V., 2007. Differential association between HERG and KCNE1 or KCNE2. *PLoS ONE* 2, e933.
- Viloria, C.G., et al., 2000. Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K⁺ channel gating. *Biophys. J.* 79, 231–246.
- Warmke, J.W., Ganetzky, B., 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3438–3442.
- Weerapura, M., et al., 2002. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J. Physiol.* 540 (1), 15–27.
- Zhou, Z., et al., 1998. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J. Biol. Chem.* 273, 21061–21066.

4.3 Le résidu aromatique F627 de la protéine hERG joue un rôle crucial dans les phénomènes d'inactivation, de sélectivité ionique et de sensibilité pharmacologique du canal

4.3.1 Introduction

Une mutation localisée dans le domaine du pore, dans la boucle S5-S6 de la protéine hERG a été identifiée chez un patient atteint de SQT. Cette mutation cause le remplacement d'un résidu phénylalanine par une leucine à la position 627 (Splawski et al., 2000; Chang et al., 2002; Lin et al., 2008).

La mutation p.F627L est localisée au sein de la séquence GFG, synonyme de la séquence GYG des autres canaux potassiques. Cette séquence, très conservée, joue un rôle très important pour la conduction sélective du canal hERG, qui véhicule 100 fois plus de potassium que de sodium (Heginbotham et al., 1994). De plus, il a été montré, dans le canal KcsA, que ce résidu aromatique, via différentes interactions, joue un rôle clé dans la structure du pore du canal (Doyle et al., 1998).

En outre, il a été montré par mutagenèse dirigée que les résidus localisés près du filtre de sélectivité, dans la région T623 à V659 jouent un rôle important pour l'affinité de différents bloqueurs du canal hERG (Mitcheson et al., 2000b; Kamiya et al., 2006).

Dans cette étude, nous avons voulu explorer les propriétés électrophysiologiques du variant F627L. Nous avons analysé ses effets sur les propriétés biophysiques du courant hERG ainsi que sur la sensibilité du canal à deux molécules : un bloqueur spécifique, E4031 et un anti-arythmique, le dofétilide.

4.3.2 Méthodes

4.3.2.1 Système d'expression

Les mesures ont été faites en voltage-clamp à double microélectrode dans l'ovocyte de Xénope et à température ambiante. Les ovocytes ont été injectés d'une même quantité d'ARN messagers (200 ng) codants pour la protéine hERG WT, la protéine hERG F627L ou bien d'un mélange des deux afin de reproduire la condition hétérozygote.

4.3.2.2 Solutions et perfusion extracellulaire

Un système de perfusion par gravité avec un débit constant de 0,5 mL/min a été utilisé pour perfuser les ovocytes avec différentes solutions. Le changement complet de la solution où sont baignés les ovocytes se fait en moins de 10 secondes.

La solution de Ringer contrôle contient: (en mM): 116 NaCl, 2 KCl, 0,5 CaCl₂, 2 MgCl₂, et 5 HEPES (pH ajusté à 7,6 avec NaOH).

Pour les enregistrements effectués en présence de différentes concentrations intracellulaires en Na⁺ et K⁺, une quantité équimolaire d'ions N-méthyl-D-glucosamine (NMDG⁺) a été utilisée pour remplacer les ions Na⁺ et K⁺ afin de maintenir une osmolarité constante (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Composition des solutions utilisées lors de différentes expérimentations (en mM).

	[NaCl]	[KCl]	[NMDG]	[CaCl ₂ - 2H ₂ O]	[MgCl ₂ - 8H ₂ O]	[HEPES]
Solution 1	116	2	0	0,5	2	5
Solution 2	58	2	58	0,5	2	5
Solution 3	29	2	87	0,5	2	5
Solution 4	14,5	2	101,5	0,5	2	5
Solution 5	58	0,58	57,4	0,5	2	5
Solution 6	58	5,8	52,2	0,5	2	5
Solution 7	58	29	29	0,5	2	5
Solution 8	58	58	0	0,5	2	5

4.3.2.3 Caractérisation biophysique

Les méthodes utilisées pour l'évaluation des caractéristiques fonctionnelles du courant hERG sont identiques à celles précédemment décrites (Christe et al., 2008; Lin et al., 2008).

Les mesures de la voltage-dépendance de l'activation et de l'inactivation ont été ajustées par une fonction de Boltzmann:

$$y = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{S}\right)}}$$

où V_m est le potentiel de commande, $V_{1/2}$, le potentiel de demi-activation ou de demi-inactivation et S gouverne la pente de la courbe au point $V_{1/2}$.

L'évaluation du potentiel d'inversion (E_{rev}) a été réalisée en utilisant un protocole de voltage particulier combinant un créneau et des rampes de voltage. Le courant mesuré durant les rampes montantes et descendantes a été porté en fonction du voltage. Une correction de l'effet de la capacité membranaire a été faite en soustrayant la moitié de la différence entre le courant à -140 mV de la rampe descendante et celui de la rampe montante. La valeur du potentiel d'inversion est alors mesurée à la valeur zéro courant dans la rampe montante. Les valeurs estimées par ce protocole particulier sont identiques (± 2 mV) à celles mesurées classiquement lorsqu'on porte les valeurs de courant du deuxième créneau de voltage du protocole de désactivation (prises 45 ms après le début du créneau 2) (**Figure 24**).

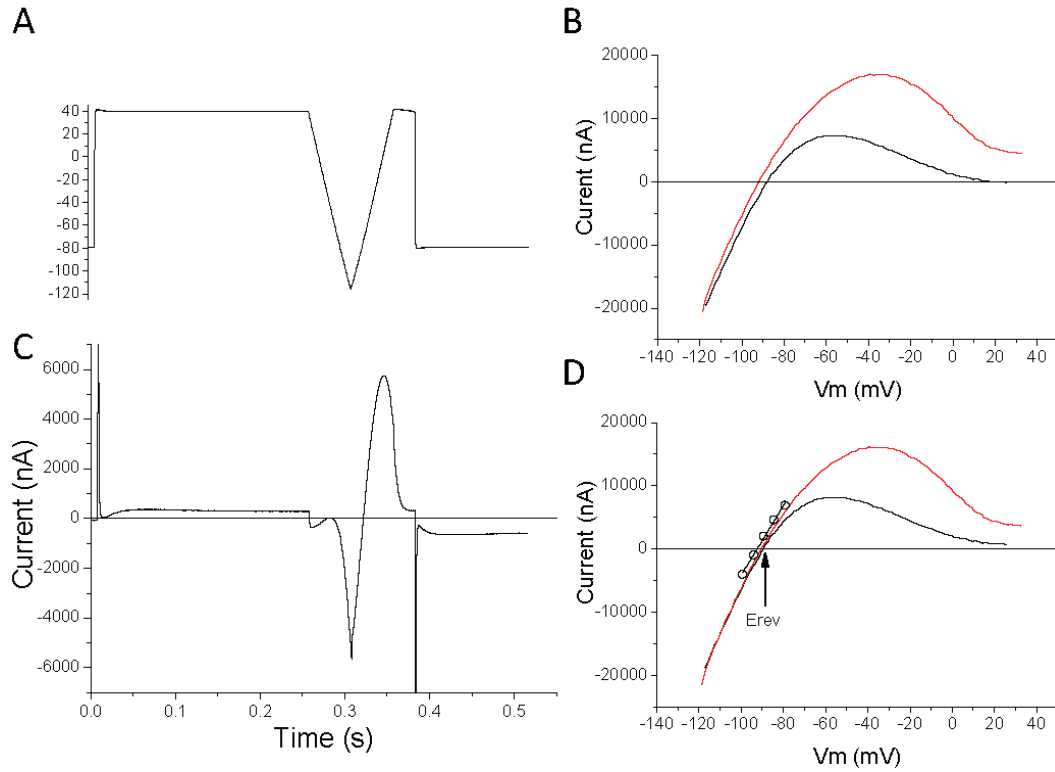


Figure 24 : Analyse du potentiel d'inversion du courant hERG.

Un protocole de voltage particulier combinant un créneau et des rampes a été utilisé (A). Le courant enregistré est montré en (C). Les courants mesurés pendant les rampes descendantes et montantes sont portés en fonction du voltage avant (B) et après (D) correction de l'artefact dû à la capacité membranaire. En D, les cercles montrent la mesure des courants sur la même cellule 40 ms après le début du deuxième créneau de voltage, suivant la méthode conventionnelle.

4.3.2.4 Evaluation des perméabilités fractionnelles

La perméabilité fractionnelle des canaux hERG pour chaque ion a été évaluée par ajustement des variations d'Erev en présence de différentes concentrations extracellulaires en $[Na^+]$ ou $[K^+]$ par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) (Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949).

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \log_n \frac{(P_{Na} * [Na^+]_o + P_K * [K^+]_o + P_{NMDG} * [NMDG^+]_o + P_{Ca} * [Ca^{2+}]_o + P_{Cl} * [Cl^-]_i)}{(P_{Na} * [Na^+]_i + P_K * [K^+]_i + P_{NMDG} * [NMDG^+]_i + P_{Ca} * [Ca^{2+}]_i + P_{Cl} * [Cl^-]_o)}$$

où E_{rev} est la valeur du potentiel d'inversion, $[Na^+]$, $[K^+]$, $[NMDG^+]$, $[Ca^{2+}]$ et $[Cl^-]$ sont les concentrations respectives des ions Na^+ , K^+ , $NMDG^+$, Ca^{2+} et Cl^- , P_{Na} , P_K , P_{NMDG} , P_{Ca} et P_{Cl} sont leurs perméabilités respectives. Le suffixe o se réfère à la concentration

extracellulaire et le suffixe i se réfère à la concentration intracellulaire. Les concentrations intracellulaires des ions dans l'ovocyte de Xénope ont été établies par Dascal (Dascal, 1987): (en mM) 22,5 $[\text{Na}^+]_i$, 150 $[\text{K}^+]_i$, 0 $[\text{NMDG}^+]_i$, 10^{-7} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and 62 $[\text{Cl}^-]_i$.

4.3.2.5 Evaluation de la sensibilité aux bloqueurs

Afin d'évaluer la sensibilité aux bloqueurs, les ovocytes sont soumis à une dépolarisation de 6 secondes à 0 mV, appliquée toutes les 12 secondes. Le protocole est appliqué avant et pendant la perfusion des bloqueurs afin d'explorer le développement complet du blocage des canaux. La valeur au pic du courant de queue observée lors du retour à -80 mV est mesurée et on lui soustrait celle mesurée 4 secondes plus tard.

Pour évaluer le degré d'inhibition, on calcule pour chaque ovocyte le rapport entre le courant maximal mesuré en présence de la molécule et celui mesuré avant.

Les doses utilisées sont celles qui produisent 80% du blocage du courant hERG WT exprimé dans les ovocytes de Xénope: 1 μM pour le dofétilide (Ficker et al., 1998) et 5,7 μM pour E4031 (Kamiya et al., 2006).

4.3.2.6 Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. La comparaison des résultats est évaluée par un test-t et est donnée significative pour une valeur de $p < 0,05$. Des résultats jugés significatifs sont indiqués par une étoile (*) dans les figures.

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 Relation courant-voltage

Tout d'abord, l'amplitude du courant hERG a été étudiée grâce à l'application d'un protocole conventionnel à double créneau de voltage (**Figure 25A**). A partir d'un potentiel de maintien à -80 mV, les ovocytes sont dépolarisés pendant 2 secondes par des créneaux allant de -80 mV à +60 mV avec un incrément de 10 mV. Les ovocytes sont ensuite hyperpolarisés pendant 3 secondes à -120 mV avant de retourner au potentiel de maintien.

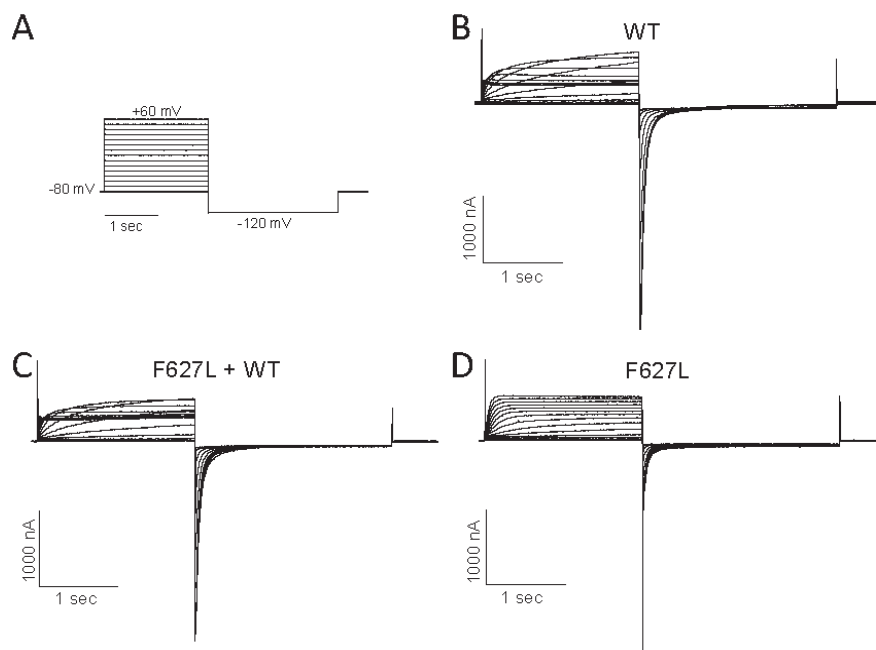


Figure 25 : Tracés représentatifs du courant hERG.

Le courant est mesuré en réponse à l'application d'un protocole de voltage-clamp (**A**) sur des ovocytes de Xénope injectés par de l'ARNm hERG WT (**B**), d'un mélange d'ARNm WT et F627L (**C**), ou bien d'ARNm hERG F627L seul (**D**).

Lorsqu'on porte les valeurs de courant mesurées à la fin du premier créneau dépolarisant en fonction du voltage, on observe que la mutation F627L, exprimée seule ou en mélange avec le WT, entraîne une voltage-dépendance du courant différente de celle observée chez le WT seul (**Figure 26A**). En effet, la mutation entraîne une perte de l'allure en cloche caractéristique du courant hERG. La rectification entrante observée pour des voltages supérieurs à 0 mV est alors perdue et le courant augmente linéairement avec l'amplitude de la dépolarisation. L'amplitude du courant, qui est plus faible chez le mutant ou l'hétérozygote par rapport au WT, en dessous de 0 mV, devient largement supérieure pour de grandes dépolarisations.

Lorsqu'on mesure l'amplitude du courant au début du deuxième créneau de voltage, on observe que la mutation cause une diminution d'environ 55% du courant de queue. Concernant la condition hétérozygote, le courant est diminué de 40% (**Figure 26B**).

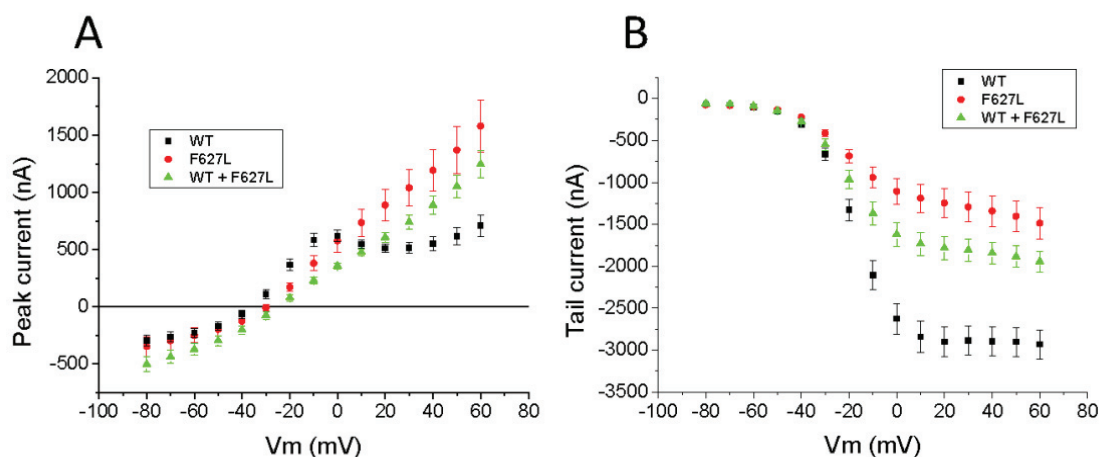


Figure 26 : Effets de la mutation F627L sur l'amplitude du courant hERG.

Les valeurs de courant mesurées à la fin du premier créneau (A) et celles mesurées au pic pendant le deuxième créneau (B) sont portées en fonction du voltage pour les trois conditions. La mutation F627L entraîne une perte de la rectification durant la dépolarisation (créneau 1) et diminue l'amplitude du courant de queue.

4.3.3.2 Activation à l'état stable

La voltage-dépendance de l'activation à l'état stable a été examinée en portant les valeurs de courant mesurées pendant le deuxième créneau de voltage. Les données ont été ajustées à une fonction de Boltzmann et on a observé un décalage négatif du voltage de demi-activation chez le mutant seul et chez l'hétérozygote ($-22,7 \pm 2,8$ mV pour F627L et $-19,0 \pm 0,8$ pour F627L+WT contre $-16,6 \pm 0,5$ mV pour le WT) (Figure 27A et Tableau 6). Concernant la constante de temps d'activation, la mutation F627L n'entraîne aucun changement significatif (Figure 27B).

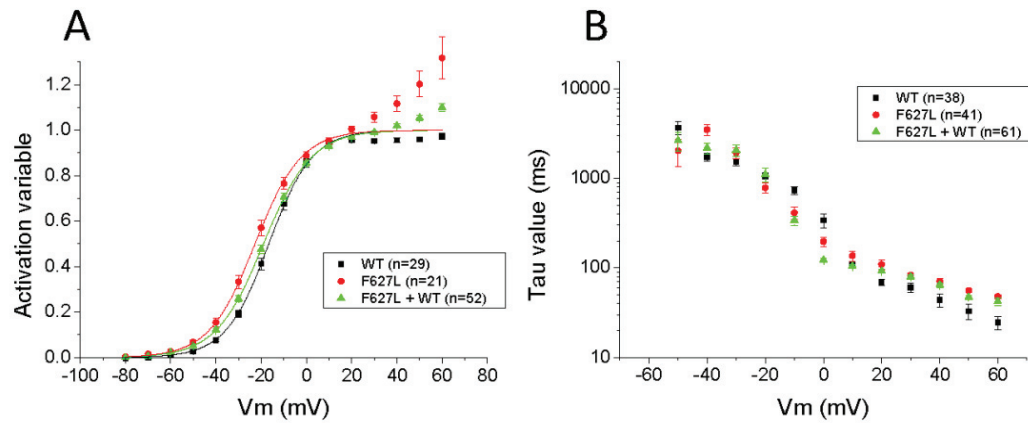


Figure 27 : Cinétiques d'activation du courant hERG.

A. Variable d'activation à l'état stable du courant hERG enregistré dans les ovocytes de Xénope. **B.** Les constantes de temps d'activation sont évaluées après ajustement à une fonction exponentielle du décours du courant pendant le premier créneau.

4.3.3.3 Cinétiques de désactivation

Les caractéristiques de la désactivation ont été explorées par un protocole de voltage différent (**Figure 28**). A partir du potentiel de maintien à -80 mV, les ovocytes sont d'abord dépolarisés pendant 2 secondes à +40 mV avant d'être repolarisés par des créneaux de 8 secondes allant de -120 mV à +20 mV avec un incrément de 10 mV.

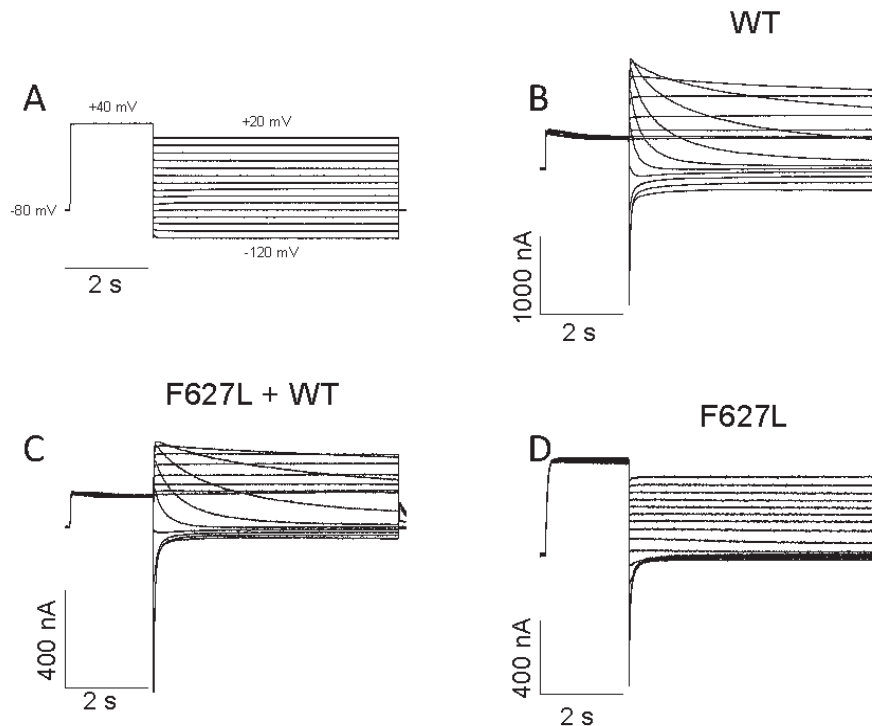


Figure 28 : Processus de désactivation du courant hERG.

Mesure du courant en réponse au protocole de voltage-clamp présenté en (A) dans les ovocytes injectés avec de l'ARNm hERG WT (B), avec un mélange WT + mutant (C), ou bien avec de l'ARNm du mutant seul (D).

Les traces de courant ont été ajustées par une fonction triple exponentielle :

$$y = I_{\text{recov}} * \exp(-t/t_{\text{recov}}) + I_{\text{fast}} * \exp(-t/t_{\text{fast}}) + I_{\text{slow}} * \exp(-t/t_{\text{slow}}) + I_{\text{inf}}$$

Ainsi, on modélise l'existence de trois sous-populations de canaux possédant des cinétiques de désactivation différentes (Christe et al., 2008) : une sous population de canaux qui se désactivent rapidement (fast), une sous-population de canaux qui se désactivent lentement (slow) et une troisième sous-population de canaux qui ne se désactivent pas (Inf). La composante « recov » correspond à la levée de l'inactivation causée par le premier créneau.

Bien que la mutation, lorsqu'elle est exprimée seule, modifie l'allure des tracés du courant de désactivation (**Figure 28**), on observe qu'elle ne modifie pas les constantes de temps lente et rapide (**Figure 29A**).

Quant au potentiel d'inversion du courant, celui des canaux mutés exprimés seuls est de 20 à 50 mV plus positif que celui du WT (**Figure 29B**). De plus, on observe que la conductance reste inchangée.

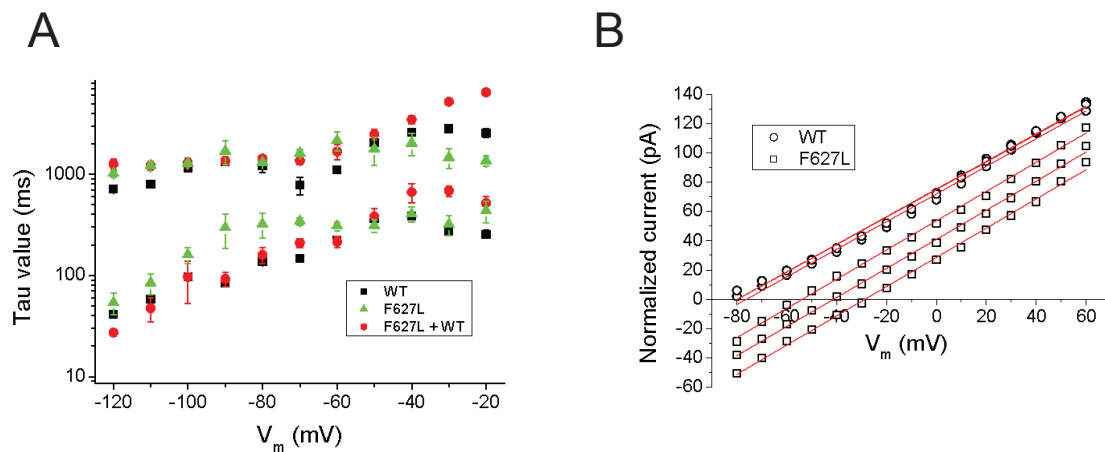


Figure 29 : Effet de la mutation F627L sur la désactivation du courant hERG.

A. Les constantes de temps lente et rapide de désactivation dans la condition F627L et F627L+WT sont similaires à celles du WT. **B.** Courant instantané porté en fonction du voltage. La mutation ne modifie pas la conductance des canaux mais provoque un décalage positif du potentiel d'inversion.

4.3.3.4 Caractéristiques de l'inactivation

Le protocole de voltage utilisé pour caractériser les cinétiques de l'inactivation du courant hERG est illustré dans la **Figure 30**. La constante de temps d'inactivation a été évaluée par ajustement du courant par une fonction simple exponentielle.

Pour F627L, après être retourné à des voltages positifs, il n'y a aucun signe d'inactivation dépendante du voltage. Ainsi, la mutation est responsable d'une perte complète de l'inactivation. Cependant, lorsque F627L est coexprimé avec le WT, le processus d'inactivation est bien présent mais avec une constante de temps plus courte que chez le WT, surtout entre -70 et -20 mV (**Figure 30D**).

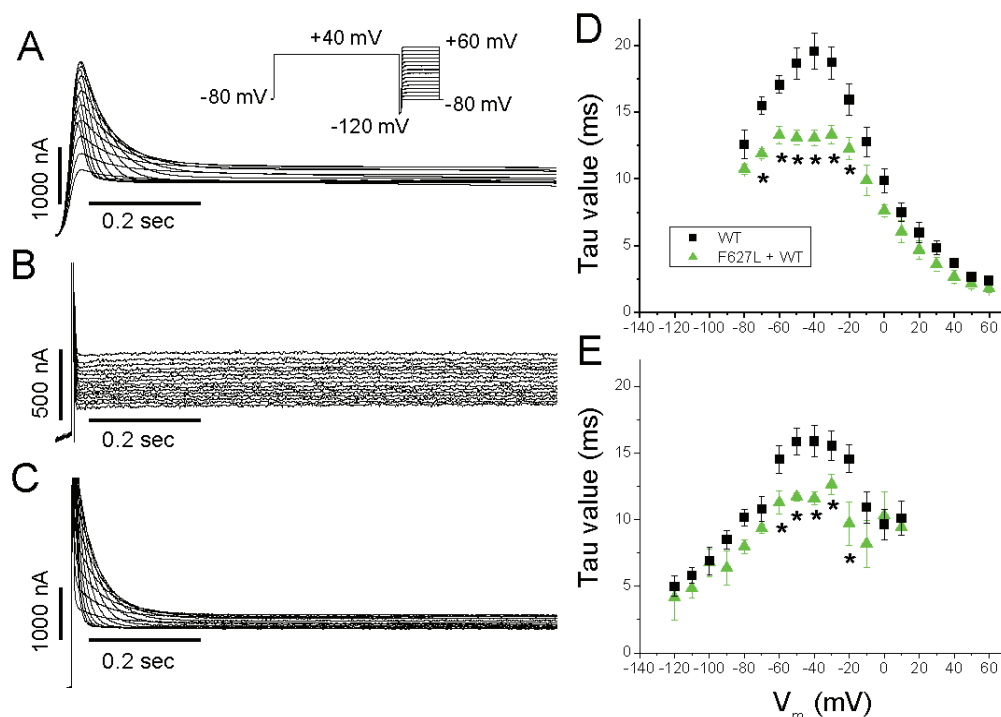


Figure 30 : Processus d'inactivation du courant hERG.

Inactivation du courant en réponse à un protocole de voltage-clamp standard dans les ovocytes injectés avec soit de l'ARNm WT (**A**), soit de l'ARNm du mutant seul (**B**), ou soit avec un mélange WT + mutant (**C**). En (**D**) sont portées les valeurs de constante de temps d'inactivation et en (**E**) sont portées celles de la levée de l'inactivation. Seules les conditions WT et F627L+WT ont été analysées (n=9 for WT and n=4 for F627L+WT). * p<0,05 avec un test de Student.

Les paramètres de l'inactivation à l'état stable montrent un décalage négatif de 17 mV du potentiel de demi-inactivation ($V_{1/2i}$) en condition hétérozygote comparé au WT ($-111,2 \pm 7,3$ mV vs $-94,7 \pm 3,9$ mV). Il n'y a pas de changement significatif de la valeur de la pente (Si) (**Figure 31**, **Tableau 6**).

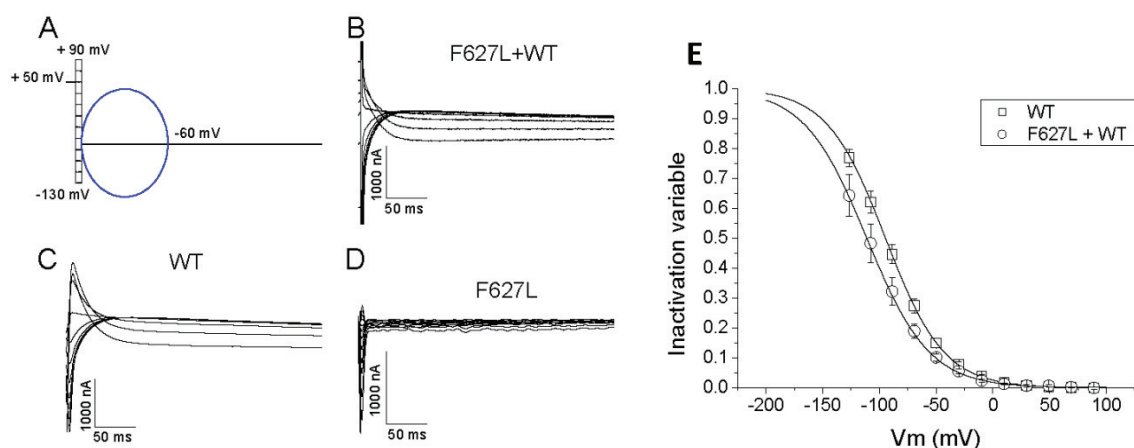


Figure 31 : Inactivation à l'état stable du courant hERG.

Elle a été analysée dans les ovocytes de Xénope à -60 mV en réponse au protocole en (A). Notons que contrairement à la condition hétérozygote (B) et au WT (C), le courant F627L (D) ne montre aucune trace d'inactivation temps-dépendante. La variable d'inactivation à l'état stable est représentée en fonction du voltage (E). Dans la condition F627L+WT on observe un décalage négatif de la courbe par rapport au WT. Les données (symboles) sont ajustées par des équations de Boltzmann (lignes).

Tableau 6 : Valeurs des paramètres des fonctions de Boltzmann ajustées aux données de l'activation et de l'inactivation.

	Activation		Inactivation	
	V1/2 _a	S _a	V1/2 _i	S _i
WT	-16,6 ± 0,5 (29)	-9,6 ± 0,5 (29)	-94,7 ± 3,9 (6)	25,8 ± 1,1 (6)
F627L	-22,7 ± 2,8* (21)	-10,2 ± 2,4 (21)	-	-
WT+F627L	-19,0 ± 0,8* (52)	-10,6 ± 0,7 (52)	-111,2 ± 7,3* (4)	27,6 ± 1,9 (4)

V1/2_a et V1/2_i correspondent respectivement au potentiel de demi-activation et de demi-inactivation. De même pour S_a et S_i qui correspondent aux valeurs de pentes. * p<0,05 vs WT. Entre parenthèses, le nombre d'ovocytes mesurés.

La constante de temps de la levée de l'inactivation est donnée par l'analyse multi-exponentielle du décours du courant pendant le deuxième créneau de voltage du protocole de désactivation. Les valeurs sont reportées dans la **Figure 30E**. Les valeurs sont à superposer avec celles données pour l'inactivation (**Figure 30D**). Là aussi, on observe des valeurs de constantes de temps plus courtes pour la condition hétérozygote.

4.3.3.5 Etude de la sélectivité ionique

Le potentiel d'inversion (E_{rev} : reversal potential) du courant hERG a été analysé par l'application d'un protocole de voltage particulier constitué d'une combinaison de rampes de voltages (voir méthodes). Concernant le WT, E_{rev} est mesuré en moyenne à $-84,0 \pm 3,2$ mV ($n=6$) en condition contrôle, lorsque les ovocytes sont perfusés par une solution de Ringer. Pour le mutant seul, le potentiel d'inversion est mesuré à $-38,8 \pm 8,1$ mV ($n=8$). En coexpression avec le WT, le potentiel d'inversion est similaire à celui mesuré pour le WT ($-88,5 \pm 2,15$ mV, $n=6$) (**Figure 32**).

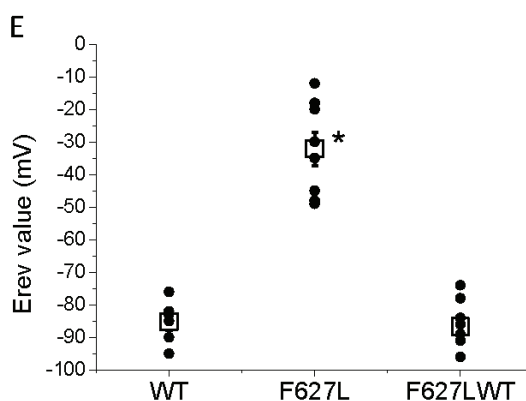


Figure 32 : Effet de la mutation F627L sur le potentiel d'inversion du courant hERG.

Le potentiel d'inversion est mesuré en utilisant un protocole de voltage particulier combinant un créneau et des rampes (**Figure 24**). Les valeurs individuelles d' E_{rev} (cercles pleins) et leurs moyennes (carrés ouverts) sont portés dans les trois conditions.

Le décalage du potentiel d'inversion d'environ 46 mV observé avec F627L par rapport au WT suggère que la mutation entraîne un changement dans la sélectivité ionique du canal. Afin d'évaluer cette sélectivité ionique, les ovocytes ont été perfusés par un flux de solution de Ringer dont les concentrations en sodium et/ou potassium ont été modifiées (voir méthodes). Les mesures ont été faites après avoir atteint l'état d'équilibre.

Pour les canaux WT, une diminution de la concentration extracellulaire en sodium entraîne un abaissement de la valeur de E_{rev} (**Figure 33**) ($-85,2 \pm 2,7$ mV pour 116 mM $[Na^+]_e$; $-105,0 \pm 6,5$ mV pour 14,5 mM $[Na^+]_e$). Cet abaissement est aussi observé dans les ovocytes exprimant les canaux mutés mais tout en gardant un écart d'environ +50 mV par

rapport au WT pour chaque concentration de sodium (**Figure 33**). En condition hétérozygote, les valeurs mesurées sont toutes identiques à celles du WT.

Concernant la concentration extracellulaire en potassium, on observe chez le WT, une très forte diminution du potentiel d'inversion au fur et à mesure que l'on diminue le potassium (**Figure 33**) ($-20,6 \pm 1,9$ mV pour 58 mM $[K^+]_e$; $-105,5 \pm 6,6$ mV pour 0,58 mM $[K^+]_e$). Pour les canaux mutés, cette diminution est beaucoup moins importante. Les canaux sont donc moins sensibles au potassium extracellulaire. En effet, bien que la valeur de E_{rev} soit très proche de celle mesurée pour le WT à 58 mM $[K^+]_e$, elle devient très supérieure lorsque $[K^+]_e$ est abaissée : à 0,58 mM $E_{rev} = -60,4 \pm 5,3$ mV.

Les données des différents potentiels d'inversion mesurés ont été ajustées avec l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) afin d'évaluer les perméabilités relatives à chaque ion (**Figure 33**, lignes rouges). Concernant le WT, les données ont été simultanément ajustées par la même équation de GHK. Ceci permet d'estimer des perméabilités fractionnelles $P_{Na} = 0,028$ et $P_K = 0,972$ (avec une perméabilité relative à $P_{Na}/P_K = 0,03$). Pour le mutant, il a été impossible d'ajuster les données par la même fonction pour les variations de sodium et de potassium, le modèle ne convergeait pas. Lorsque les données pour le potassium étaient assez bien ajustées ($P_{Na} = 0,21$ et $P_K = 0,79$ ($P_{Na}/P_K = 0,27$)), les données pour le sodium ne l'étaient pas. Un bien meilleur résultat a été obtenu après avoir inclus dans le modèle une perméabilité relative aux ions NMDG⁺, utilisés en remplacement des ions Na^+ et K^+ . Les perméabilités qui en résultent sont : $P_{Na} = 0,23$, $P_K = 0,657$ ($P_{Na}/P_K = 0,35$) et $P_{NMDG} = 0,113$ ($P_{NMDG}/P_K = 0,17$). En revanche, ces valeurs ne permettaient pas d'ajuster les valeurs d' E_{rev} pour le potassium.

Ainsi, la mutation F627L semble altérer profondément la sélectivité ionique du canal hERG qui devient alors perméable à de gros ions tels que le NMDG⁺ (diamètre moyen de 730 pm (Villarroel et al., 1995), alors que celui du sodium et du potassium sont respectivement 190 pm et 266 pm (Bezanilla and Armstrong, 1972; Wang et al., 2009).

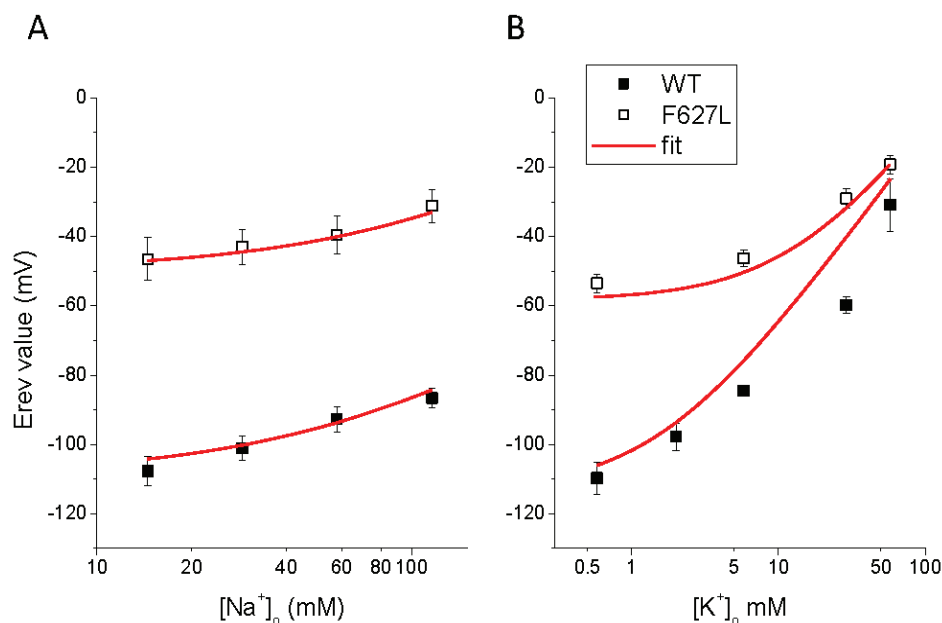


Figure 33 : Analyse de la spécificité ionique du canal hERG.

Analyse des variations du potentiel d'inversion (E_{rev}) en fonction des concentrations de sodium (**A**) et de potassium (**B**) extracellulaires. Les données (symboles) ont été ajustées par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (ligne rouge), $n=6$ pour WT and $n=8$ pour F627L (voir détails dans le texte).

4.3.3.6 Sensibilité à deux bloqueurs

Du point de vue de la localisation de la mutation (au niveau du domaine du pore), il a été important de tester la réponse du mutant face à des inhibiteurs connus de hERG.

Afin de tester la sensibilité du canal hERG à ces différents bloqueurs, un protocole à un seul créneau de voltage a été utilisé et répété toutes les 12 secondes (**Figure 34A**). Le blocage du canal a été mesuré en portant les valeurs de courant de queue faisant suite au créneau dépolarisant, avant et 15 minutes après une exposition continue à la molécule.

Le blocage par E4031 ou par le dofétilide a été progressif dans le temps avec une constante de temps d'environ 3 minutes.

Concernant la réponse à E4031, on observe que F627L induit une perte de sensibilité à ce composé. Le courant maximal est diminué seulement de $8,6 \pm 3,5\%$ comparé au WT où il est diminué de $80,1 \pm 0,5\%$ pour une concentration en E4031 de $5,7 \mu\text{M}$. En coexpression, la sensibilité à la molécule est restaurée ($78,8 \pm 5,4\%$) (**Figure 34B**).

Pour le dofétilide, F627L induit aussi une perte de sensibilité. Pour une dose de $1 \mu\text{M}$, le courant maximal est inhibé de seulement $10,6 \pm 5,0\%$ chez le mutant seul alors qu'il est

diminué de $77 \pm 10.3\%$ chez le WT. En coexpression, on a une réponse intermédiaire où le courant est diminué de $39,1 \pm 8,0\%$ (**Figure 34C**).

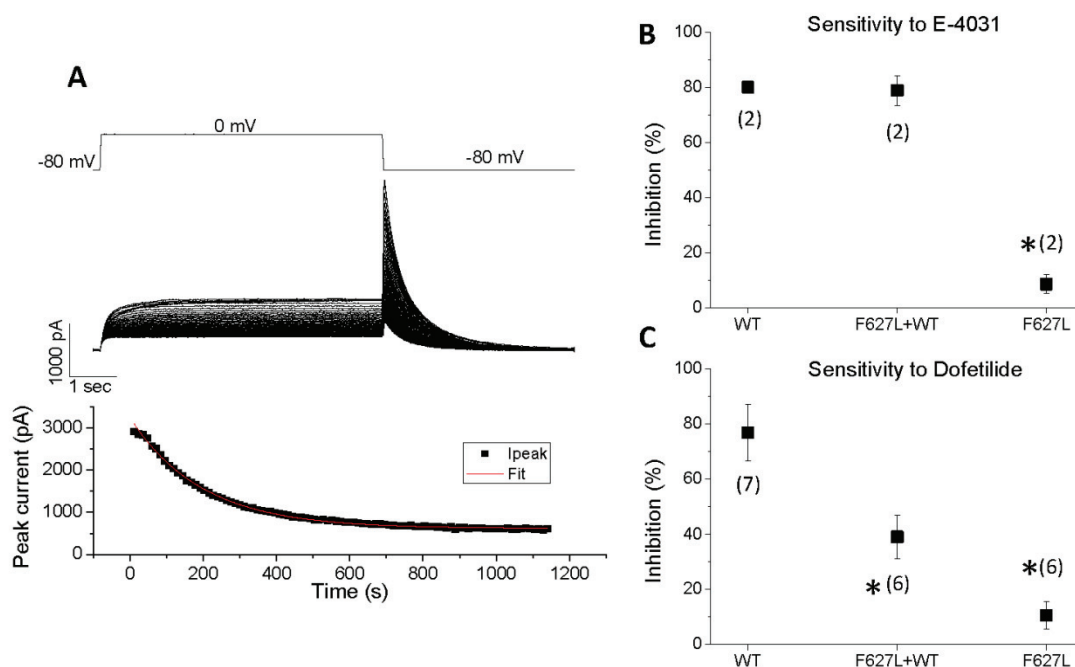


Figure 34 : Effets de la mutation F627L sur la sensibilité de hERG à E4031 et au dofétilide.

L'E4031 à $5,7 \mu\text{M}$ et le dofétilide à $1 \mu\text{M}$ ont été appliqués en perfusion continue. La diminution dépendante de la stimulation du canal a été suivie en appliquant un créneau dépolarisant à 12 secondes d'intervalle (**A** tracés du haut). La valeur au pic, diminuée de la valeur à l'état stable (tracés du milieu en **A**) mesurait la disponibilité du courant hERG qui a été portée en fonction du temps (tracé du bas en **A**). La valeur calculée du pourcentage d'inhibition mesuré à l'état stable ($\pm$ SEM) par l'E4031 (**B**) ou par le dofétilide (**C**) est comparée dans le F627L et le F627L+WT à la valeur correspondante dans le WT. Entre parenthèses figure le nombre de mesures.

4.3.4 Discussion

Cette étude caractérise les effets de la mutation F627L de KCNH2 sur les propriétés électrophysiologiques du courant hERG. Une étude partielle avait déjà été menée en 2008 par Lin et al. (Lin et al., 2008). Comme rapporté précédemment, cette mutation, exprimée seule, est responsable d'une diminution très importante du courant hERG maximal. En coexpression avec le WT, nous avons observé une diminution de près de 40% de l'amplitude du courant de queue. Lorsque F627L est exprimé seul, le courant est diminué d'environ 55% par rapport au WT (**Figure 26**). Lin et al. ont mesuré un courant négligeable à -60 mV , ce qui

peut s'expliquer par le fait que le potentiel d'inversion des canaux mutés est fortement altéré, et qu'à ce potentiel, le courant net est nul.

Cette diminution très importante du courant a été expliquée par Lin et al. par un défaut d'adressage des protéines mutées à la membrane. Les western-blots des cellules transfectées par F627L montraient que ces cellules exprimaient beaucoup moins de protéines hERG matures et immatures que les cellules exprimant la protéine WT.

La mutation F627L est aussi responsable d'une perte de la rectification entrante (**Figure 26**) qui s'accompagne d'une perte complète du processus d'inactivation (**Figure 30**). Une même perte de rectification du courant hERG a déjà été rapportée chez le double mutant G628C:S631C, qui entraîne aussi une perte d'inactivation (Smith et al., 1996). Ces différentes observations étayent l'idée que l'inactivation est responsable de la rectification entrante (Shibasaki, 1987; Smith et al., 1996; Spector et al., 1996). Une autre mutation, N629D, située deux acides aminés en aval, produit un courant s'activant rapidement mais ne s'inactivant pas (Lees-Miller et al., 2000). Ces différents exemples, montrent que cette petite partie de la protéine pourrait jouer un rôle clé dans le contrôle du canal hERG, et plus particulièrement dans son processus d'inactivation de type C.

A notre connaissance, une seule autre mutation de hERG sur le résidu F627 a été étudiée dans le passé. Il s'agit de la mutation F627Y qui accélère significativement l'inactivation du courant hERG (Guo et al., 2006) en plus d'accélérer sa désactivation (Gang and Zhang, 2006). Ces deux effets concourent en une réduction de l'amplitude de courant à une concentration physiologique de potassium extracellulaire. Cependant, la mutation F627Y n'altère pas la maturation ni l'adressage des protéines à la membrane (Wang et al., 2009), ce qui diffère de la mutation F627L. Il est à noter qu'elle n'altère pas non plus le potentiel d'inversion et qu'elle consiste en un remplacement de la phénylalanine aromatique par une tyrosine qui est également aromatique.

La forte diminution de la sélectivité ionique due à la mutation F627L, constitue la nouveauté majeure qu'apporte cette étude. En effet, la mutation entraîne un décalage positif du potentiel d'inversion, ce qui traduit une diminution de la sélectivité potassique chez le mutant vis-à-vis du sodium (**Figure 33**). De plus, nous avons montré que les canaux mutés deviennent probablement perméables à des ions beaucoup plus gros en taille, comme les ions NMDG⁺ présents dans nos solutions en remplacement du sodium extracellulaire. Lees-Miller et al. (Lees-Miller et al., 2000) ont rapporté un décalage similaire du potentiel d'inversion chez le mutant N629D (-17 ± 6 mV versus -90 ± 3 mV pour le WT)

s'accompagnant aussi d'une diminution de la sélectivité potassique ($P_{Na}/P_K=0,65$ vs $0,01$ pour le WT) mais en conservant une faible perméabilité pour le NMDG ($P_{NMDG}/P_K=0,03$).

La structure du filtre de sélectivité de hERG est stabilisée par des ponts hydrogène et des interactions de van der Waals entre F627 et F617 et entre F627 et Y616 (Vandenberg et al., 2012). On pourrait penser que la mutation F627L induit une perte de ces interactions et cause une déstructuration du pore. Ceci pourrait expliquer la perte de sélectivité des canaux F627L ainsi que leur perte de sensibilité à différentes molécules. En condition hétérozygote, le potentiel d'inversion n'est pas altéré. Ceci suggère que l'intégrité du filtre de sélectivité ainsi que celle du pore sont conservées si au moins une sous-unité WT est présente dans les tétramères.

La mutation F627L exprimée seule cause une large diminution de la sensibilité au dofétilide. Lees-Miller et al. (Lees-Miller et al., 2000) proposent un modèle où les changements séquentiels allostériques, comprenant l'activation et l'inactivation, sont nécessaires pour l'association à haute affinité avec le dofétilide. Dans ce modèle, l'ouverture de la porte d'activation détermine l'accès pour le dofétilide au vestibule intérieur de hERG, alors que le processus d'inactivation apparaît comme nécessaire à l'association de haute affinité du dofétilide à son site de fixation présent dans le domaine S6.

Herzberg et al. (Herzberg et al., 1998) ont montré que la séquence nucléotidique de hERG requise pour l'inactivation est aussi nécessaire pour induire une sensibilité au E4031. En effet, l'inclusion de cette séquence dans des canaux ne montrant pas d'inactivation apparente et étant insensibles au E4031, permet de corriger ces deux paramètres. Cette hypothèse est étayée par Ficker et al. (Ficker et al., 1998) qui ont montré que la mutation S620T de hERG, qui cause une perte totale de l'inactivation, induit, en même temps, une forte diminution de l'affinité au dofétilide. Ainsi, on peut supposer que la perte de sensibilité à l'E4031 et au dofétilide observée chez le mutant, peut être due à la perte de l'inactivation observée dans les ovocytes exprimant F627L.

4.3.5 Conclusion

Le résidu F627 de la protéine hERG est situé dans le motif GFG qui gouverne la sélectivité ionique du canal. Cette étude confirme l'importance de ce résidu aromatique dans le maintien des propriétés biophysiques du canal hERG. Elle révèle que la mutation F627L du gène KCNH2 modifie profondément les processus d'inactivation, de désactivation, ainsi que

la sensibilité du canal à deux inhibiteurs connus de hERG. Cependant, une partie de ces effets sont abolis lorsque la mutation est coexprimée avec le WT.

En coexpression, l'altération des caractéristiques de l'inactivation à l'état stable en fonction du voltage cause une diminution de 27% de l'amplitude du courant hERG. Ceci peut en partie expliquer l'augmentation de la durée de l'intervalle QT trouvée chez les patients hétérozygotes pour la mutation, qui peut les prédisposer à des arythmies létales.

4.4 La mutation hHCN4/D600E annule la réponse des canaux à la suppression d'AMP cyclique et accélère leur désactivation

Article : **The minor amino acid change D600E cancels the response of HCN4 channels to cAMP suppression and accelerates deactivation**

Yohann Vincent, Asma Mechakra, Yi-Qing Yang, Mohamed Chahine, Philippe Chevalier, Georges Christé

Article soumis pour publication dans *PlosOne* (septembre 2015)

4.4.1 Introduction

Notre partenaire de Shanghai, le Dr Yi-Qing Yang nous a proposé l'étude fonctionnelle d'une mutation du gène HCN4. Cette mutation a été découverte à l'état hétérozygote chez un patient de 57 ans, atteint de fibrillation atriale isolée et présentant une bradycardie. Le patient a été initialement diagnostiqué à l'âge de 50 ans. D'après un enregistrement Holter de 24 heures, sa fréquence cardiaque oscillait entre 29 et 107 battements par minute (bpm) avec une fréquence moyenne de 59 bpm. Cette mutation n'a pas été retrouvée chez 200 individus contrôles.

Cette mutation de HCN4 porte sur un seul nucléotide et provoque la substitution d'un acide aspartique par un acide glutamique à la position 600 de la protéine (p.D600E). Elle est située sur la partie C-terminale, sur le dernier acide aminé du domaine C-linker, juste en amont du site CNDB qui joue un rôle important dans la réponse à l'AMP cyclique.

Le but de ce travail a été, dans un premier temps, d'étudier les caractéristiques biophysiques de cette mutation, puis dans un deuxième temps, de montrer un lien possible entre la présence de la mutation chez le patient et son phénotype, à savoir une bradycardie et une fibrillation atriale.

4.4.2 Résultats et discussion

Nous avons montré que la mutation D600E, exprimée seule dans les cellules Cos-7 entraîne une légère augmentation de la valeur de courant mesuré à la fin du premier créneau

pour des voltages très hyperpolarisants par rapport à la condition WT ($-19,2 \pm 3,5$ pA/pF, pour D600E, et $-11,9 \pm 2,2$ pA/pF, pour le WT, mesuré à -130 mV). Cette différence est abolie lorsque le mutant est coexprimé avec le WT ($-11,1 \pm 1,6$ pA/pF) (Figure 1 de l'article D600E). Le mutant, seul ou en coexpression, n'induit pas de modification de la vitesse de l'activation ni de sa voltage-dépendance à l'état stable (Figure 1 de l'article D600E).

Concernant les cinétiques de désactivation, D600E, seule ou en coexpression, entraîne une accélération de la vitesse de désactivation en comparaison avec la condition WT (1,6 fois plus rapide) (Figure 2 de l'article D600E).

Du fait de la localisation de la mutation, juste en avant du domaine cNBD qui fixe l'AMP cyclique, nous avons voulu tester la réponse des canaux mutés au 8-Bromo-AMPC, un analogue stable de l'AMPC.

En absence d'AMPC intracellulaire, on observe un décalage négatif de la courbe d'activation d'environ -9 mV dans les cellules exprimant le gène HCN4 WT, par rapport à un état où la concentration en AMPC dans la cellule se rapproche des conditions de base (Figure 3 et table 1 de l'article D600E). Cet effet est perdu dans les cellules exprimant la mutation seule ou en coexpression. Cependant, le décalage positif observé lorsque les sites de fixation à l'AMPC sont saturés (1 mM 8-Br-AMPC) est préservé chez le mutant (Figure 3 et table 1 de l'article D600E).

Le modèle mathématique de cellule du nœud sinusal de lapin de Severi et al. (2012) a été utilisé afin de caractériser l'effet de cette mutation sur le déroulement du courant I_f et l'activité automatique de la cellule.

Lorsqu'on accélère la désactivation du courant I_f de 1,6 fois, on observe une diminution de l'amplitude du courant I_f et de la pente de dépolarisation lente (Figure 5A de l'article D600E), ce qui pourrait rendre compte de la bradycardie observée chez le porteur.

Dans des conditions normales, la stimulation du système nerveux parasympathique, lors du repos profond, tend à diminuer le taux d'AMPC intracellulaire et donc le courant I_f , ce qui contribue partiellement à une bradycardie. Nous avons montré que la réponse du canal mutant face à une diminution de la concentration en AMPC est supprimée, ce qui annulerait la participation du courant I_f à la bradycardie induite par la stimulation parasympathique. Cet effet est cependant mineur, puisque la suppression totale du courant I_f par une forte dose d'ivabradine ne diminue que de 20% la fréquence de battement de cellules isolées du nœud sinusal humain (Verkerk et al. 2007).

4.4.3 Publication

**The minor amino acid change *D600E* cancels the response
of HCN4 channels to cAMP suppression and accelerates
deactivation**

Yohann Vincent¹, Asma Mechakra¹, Yi-Qing Yang², Mohamed
Chahine³, Philippe Chevalier¹, Georges Christé¹

¹ EA4612 Neurocardiologie; SFR Santé Lyon-Est; Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon,
France.

² Department of Cardiology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University,
Shanghai, China.

³ Institut Universitaire en Santé Mentale and department of medicine, Laval University,
Québec City, QC, Canada.

Corresponding author

E-mail: georges.christe@inserm.fr (GC)

Justification of authorship:

Yohann Vincent and Georges Christé conceived and designed the study, conducted the
experiments, performed analysis and interpretation of data, drafted the article, and made

revisions and final edition of the manuscript. Yi-Qing Yang participated in writing the manuscript. Asma Mechakra and Mohamed Chahine contributed to the design of the study and performed part of the experiments. Every author made a critical reading of and approved the version to be submitted.

This study was supported by Université Lyon 1 funding of Unit EA4612 Neurocardiologie and by donations to the "Association Lyonnaise de Lutte contre la Mort Subite" (ALMS). This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Quebec (HSFQ) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-111072 and MOP-130373). Dr. Georges Christé is a full time appointed researcher of the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (INSERM). Yohann Vincent and Asma Mechakra were each supported by a Thesis Bursary from the MESR, France. Dr. Yi-Qing Yang received support from the National Natural Science Fund of China (81270161 and 81470372).

Word count: 6897

Abstract

BACKGROUND: A heterozygous *HCN4* mutation (*p.D600E*) was reported by the COSMIC project. It was not functionally characterized.

OBJECTIVE: We investigated its effects on the biophysical properties of HCN4 channels expressed in a mammalian cell line.

METHODS: Cos-7 cells were transfected with wild-type (WT) HCN4, or a mutated *D600E* / HCN4 cDNA plasmid. To mimic a heterozygous state, a mixture of half of each (*D600E*+WT) was also transfected. A sino-atrial cell model was used to explore the consequences of the mutation when integrated with other ionic transfer mechanisms.

RESULTS: Whole-cell HCN4 current densities at -130 mV ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) in cells expressing *D600E*+WT (-11.1 ± 1.6 pA/pF) or the WT (-11.9 ± 2.2 pA/pF) were similar ($p=0.82$). In cells expressing *D600E* alone or *D600E*+WT, the kinetics of activation, reversal voltage or rectification remained unchanged whereas deactivation was accelerated 1.6 fold versus WT. The negative shift of the steady-state activation curve due to the absence of intracellular cAMP (-8.6 mV for WT) was abolished in *D600E* (+0.2 mV) and *D600E*+WT (-0.5 mV). Both of these effects suggest a dominance of mutant subunit(s) within tetrameric channels and result from a single carbon lengthening of the side chain of the aspartic acid residue at position 600 that is located outside the cAMP-binding site. When incorporated into a sino-atrial cell model, faster deactivation caused a 6% bradycardia at basal condition.

CONCLUSIONS: Dominant negative interference of mutation *D600E* with the effect of cAMP suppression on HCN4 is a novel finding that deserves further investigation.

KEYWORDS: HCN4; mutation; genetics; electrophysiology; I_f current; cyclic adenosine monophosphate; biophysics;

Introduction

The I_f current (funny current) is a nonselective cationic inward current that contributes to the spontaneous diastolic slow membrane depolarization of sino-atrial node cells [1]. In the human sinus node, the channel responsible for this current is mainly encoded by the HCN4 gene (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel type 4) [2]. HCN channels are voltage-gated ion channels activated at hyperpolarized membrane voltages. Owing to their response to β -adrenergic and cholinergic stimulations, HCN channels contribute in regulating cardiac pacemaker activity [3].

HCN channels have an evolutionary conserved structure that includes a core transmembrane domain, the CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain), and a linker region between these two domains [4]. The core domain consists of six transmembrane segments containing a pore-forming P region. The CNBD is a highly conserved region throughout HCN isoforms and HCN4 homologs in mammals and fishes (NCBI HomoloGene online sequence alignment tool) and is responsible for the control of HCN channels availability by cyclic nucleotides, such as cAMP (cyclic adenosine monophosphate) [5]. In HCN4, from a physiological level of cAMP, removal of intracellular cAMP causes a negative shift by about 10 mV of the midpoint of the steady-state activation curve, whereas elevation of intracellular cAMP above 10 μ M induces a positive shift by about 5 mV [6]. These changes respectively contribute to the slowing of cardiac rhythm under cardiac moderation due to cholinergic action (decrease of intracellular cAMP) and to acceleration due to catecholaminergic stimulation through increased intracellular cAMP. When the CNBD is deleted, as in C-terminus truncated HCN4 proteins resulting from mutations *L573X* and *E695X*, the cAMP-related shift of the activation curve is suppressed [7,8].

To date, more than 29 variants of the human HCN4 gene (hHCN4) were discovered [8–12], see also [13,14] for review. Of those, 21 were listed as mutations associated to sinus node dysfunction by Verkerk and Wilders [13,14]. A large number of the 23 mutant channels that were characterized biophysically were found to decrease the HCN4 current by different mechanisms, leading to a slowing of the heart rate [15] underlying the sick sinus syndrome and thereby favoring the occurrence of atrial fibrillation [16].

A heterozygous amino-acid substitution in HCN4 was reported by the COSMIC project [17]. The glutamic acid replaced the aspartic acid at codon 600 (*D600E*) located in the C-terminal moiety of the HCN4 protein, just proximal to the CNBD site. The functional properties of the *D600E* HCN4 channels have not been studied.

We investigated the effects of this mutation on the biophysical properties of the HCN4 channel expressed in a mammalian cell line.

Materials and Methods

Plasmids construction

The single base pair variant hHCN4/c.1800G was introduced into a hHCN4 cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) in pcDNA3 expression vector using a QuickChange site-directed mutagenesis kit according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, California), using the mutant primer forward sequence hHCN4-c.1800GF and the mutant primer reverse sequence hHCN4-c.1800GR. In a second series of experiments, a pIRES-CD8/hHCN4/c.1800C (WT) construct and a pIRES-CD8/hHCN4/c.1800G (mutated) construct were used for cell transfection, ensuring that all cells expressing CD8 had internalized the hHCN4 plasmid. The mutated site was confirmed by automatic sequencing.

Cos-7 cells culture and transfection method

Cos-7 cells (a simian cell line carrying the SV40 genetic material [18]) were obtained from Dr. Gilles Millat (EA4612, Neurocardiologie, Univ. Lyon 1, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5 % fetal calf serum (Eurobio), 100 U/mL penicillin-G sodium, and 100 µg/mL streptomycin sulfate (Eurobio) in a 95 % air, 5 % CO₂ atmosphere at 37°C. The culture medium was changed every 3 days. Other details were as previously indicated [19].

A standard calcium phosphate procedure was used for transfection of Cos-7 cells. Cells were transfected with 4 µg of WT HCN4 plasmid, or 4 µg of mutated HCN4 or a mixture of 2 µg of each to mimic the heterozygous phenotype. When the pcDNA3 constructs without CD8 were used, cells were cotransfected with 1 µg of CD8 plasmid (coding for a leukocyte surface antigen) to visualize transfected cells [20]. Just before measurements, cells were washed twice with external solution and exposed to anti-CD8-coated beads (Dynabeads, Dynal, Invitrogen). Cells decorated in anti-CD8 beads were used for electrophysiological measurements.

Electrophysiology

Patch-clamp experiments were performed at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ two to four days after transfection. A patch-clamp amplifier (BioLogic RK300, Biologic, Meylan, France) was connected, through a Labmaster 100 analog-to-digital and digital-to-analog conversion board (Axon Instruments, Foster City, California), to a 486-SX-based PC computer under Windows version 3.11. The voltage clamp was controlled by the CLAMPEX software of the pCLAMP package (version 4.0, Axon Instruments).

Patch pipettes were pulled with a List-medical L/M-3P-A puller. They had a resistance of 2 to 3 MΩ when filled with intracellular solution. Cell capacitance was evaluated from the

analysis of the charging current response to a 20 ms depolarizing pulse of 10 mV amplitude from a holding voltage of -40 mV according to the method of Reuter and Scholz [21].

The base intracellular solution contained (mM): 150 KCl, 2 MgCl₂, 5 EGTA (Ethylene-glycol tetraacetic acid), 10 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), pH was adjusted to 7.2 with potassium hydroxide. When exploring the basic properties of HCN4 channels, we added (mM) 2 Na₂-ATP (Adenosine triphosphate), 5 CP (Creatine phosphate) and 4 MgCl₂ to ensure physiological levels of Mg-ATP and CP (Mg-ATP was estimated at 1.89 mM using MaxChelator v2.10 [22]). This solution was named “control solution” thereafter. When exploring the effects of the absence of cAMP, pipettes were filled with the base intracellular solution. To test high levels of saturation of the cAMP binding site, 1 mM 8-Br-cAMP (8-Bromo-cAMP) was added from a frozen 50 mM stock solution in sterile H₂O. This analogue of cAMP was chosen for its chemical stability whereas cAMP is degraded within 200s in living cells [23]. The EC₅₀ for fixation of cAMP on HCN4 is 3.7 μM and it is 0.31 μM for 8-Br-cAMP [24].

During experiments, cells were superfused with an external solution containing (mM): NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7.4, adjusted with sodium hydroxide. Current densities (in pA/pF, picoampere per picofarad) were computed as the ratio of current to cell capacitance for each cell.

Voltage-clamp measurements

Classical command voltage protocols were applied. *Protocol 1* was a 2-pulse protocol designed to investigate the kinetics of activation. From a holding voltage at -40 mV, a first hyperpolarizing pulse of 5 s to voltage levels between -130 mV and -30 mV (with an increment of +10 mV) was applied to record the slowly activating inward current. Cells were

subsequently depolarized during 3 s at +30 mV to allow recording of the tail current, and returned to the holding voltage.

The time course of deactivation of the HCN4 currents was explored using another two-pulse voltage protocol. *Protocol 2* started from a holding voltage at -40 mV, cells were hyperpolarized during 5 seconds at -120 mV and repolarized by a 3-second rectangular pulse to various voltages from -80 mV to +60 mV with a +10 mV increment.

For evaluating the deactivation time constant, the current during pulse 2 was fitted by a single exponential function after removing the initial 300 ms of signal to avoid the initial delayed onset of deactivation.

Data analysis

In order to account for the sigmoid waveform of the initial development of the activation during a hyperpolarization, we had to represent the I_{HCN4} current by the function:

$$I_{HCN4} = G_{max} * (V_m - E_{rev}) * a_{(V_m,t)}^2 \quad (\text{Equation 1})$$

where V_m is the membrane voltage, E_{rev} , the reversal voltage, and G_{max} the maximal conductance. Note that $a_{(V_m,t)}$, the activation variable as a function of voltage and time, was elevated to power 2. This ensured that the sigmoid onset of activation was accounted for. The development of the activation variable a versus time (t, in ms) during a rectangular voltage pulse is represented by:

$$a_{(t)}^2 = (1 - e^{(-t/\tau)})^2 \quad (\text{Equation 2})$$

where τ (in ms) is the time constant of activation at the pulse voltage.

Its steady-state voltage dependence is represented by:

$$a_{(V_m)}^2 = 1/(1 + e^{(V_m - V_{ha})/S_a})^2, \quad (\text{Equation 3})$$

where V_{ha} (in mV) is the voltage of half steady-state activation and S_a (in mV), the slope factor of the activation curve.

In practice, the time constant of activation was evaluated by fitting the function

$$I(t) = Amp * (1 - e^{(-t/\tau)})^2 + Of, \quad (\text{Equation 4})$$

to each trace of time-dependent activation of the HCN4 current. Parameter '*Amp*' served to take into account the variable degree of steady-state current and '*Of*' served to cancel a steady current.

The steady-state activation versus voltage ($Act_{(V_m)}$) measurements were fitted with a function:

$$Act(V_m) = Amp / (1 - e^{(V_m - V_{ha})/S_a})^2 + Of \quad (\text{Equation 5}).$$

As a consequence, the half activation voltage (V_{ha}) in equation 5 is not the apparent one as can be read from the final plot of the function fitted on the data: we note that the apparent values are more negative than those of the function, because of the elevation to power 2. Comparisons to the data reported in the literature ought to take this into account, since, in most cases, a simple Boltzmann function is used to fit the maximal current amplitude in response to the second pulse.

In principle, when fitting a Boltzmann function to activation versus voltage data, the maximal level of activation should be documented by measurements at very negative voltages. For so doing, in our experiments, hyperpolarizations to about -200 mV should have been applied. However, it appeared in our Cos-7 cells that beyond -130 mV, large membrane breakdown currents appeared, which precluded application of larger hyperpolarizations. As we show in a Monte-Carlo study in the supporting information (S2_Appendix), failing to

document the activation data at voltages negative to -130 mV did not prevent precise determination of the half-activation voltage and slope factor by fitting a Boltzmann function (equation 5).

Modelling

The sino-atrial cell computer model of Severi et al. [25] was run under the COR environment [26]. A few changes were introduced to the model, as described in the supporting information (S1_Appendix). Each run was performed in 0-current clamping condition until a dynamic steady state was reached.

Statistics

Results were expressed as mean $\pm$ sem. Differences were qualified as significant when the t-test p-value was lower than 0.05, they are indicated by a star sign in figures.

Results

Origin of the mutation

The COSMIC project reports the finding of a unique patient carrying the D600E mutation. The patient was a 72-year female weighting 68 Kg operated for a rectum carcinoma. She showed a locoregional tumor 4 years later, shortly before death (Cosmic project data

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1562809>). No details are provided about the cardiac function of the patient.

Basic HCN4 current properties

The basic properties of the HCN4 channels were explored with pipette control solution.

A conventional two-pulse protocol (see *Protocol 1* in Methods) was applied to cells transfected with either the WT HCN4, or the *D600E* mutant or a mixture of both (Fig. 1A).

Fig. 1: Basic characteristics of HCN4 currents. **A.** Representative whole-cell currents in response to *protocol 1* (see Materials and Methods). **B.** Current values measured at the end of the hyperpolarizing pulse versus voltage. **C.** Steady-state activation curves after fitting equation 5 to the normalized maximal current values recorded during the second pulse. **D.** Values of the activation time constant evaluated by fitting an exponential function to the current during the first pulse.

The current-voltage relationship (I/V) showed an increase in the average value of the current measured at the end of the first pulse for the mutant alone as compared to the WT condition (-19.2 ± 3.5 pA/pF, $n=22$ for *D600E*, and -11.9 ± 2.2 pA/pF, $n=30$ for the WT, measured at -130 mV) but this increase was not statistically significant (Fig. 1B). However, when the mutant was cotransfected with the WT, the current density was similar to that of the WT (-11.1 ± 1.6 pA/pF at -130 mV, $n=15$) (Fig. 1B).

The mutant, alone or in cotransfection with WT channels, induced no significant difference in the steady-state activation curve (Fig. 1C and Table 1 line 2). It also did not change the kinetics of activation (Fig. 1D).

An exponential function was fitted to the time course of current deactivation during the second pulse of *Protocol 2* (see Materials and methods and Fig. 2A). It was found that the time constant values were decreased about 1.6-fold for *D600E* or *D600E*+WT, as compared to the WT condition, at all voltages explored (Fig. 2B). The mutation, alone or in co-transfection, did not change the sigmoid aspect of the onset of deactivation (see inset of Fig. 2A).

259 **Table 1: Parameters of the steady-state activation.**

	WT		D600E		D600E+WT	
	Vha	Sa	Vha	Sa	Vha	Sa
1 mM 8-Br-	-89.5 ± 1.4†	16.5 ± 1.7†	-88.8 ± 1.6†	12.6 ± 0.6*	-89.2 ± 1.4†	15.1 ± 0.8
cAMP	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=9)	(n=9)
Control	-94.8 ± 2.4	13.6 ± 0.9	-94.7 ± 1.8	13.8 ± 0.9	-93.1 ± 1.3	14.8 ± 0.6
	(n=19)	(n=19)	(n=13)	(n=13)	(n=22)	(n=22)
0cAMP	-103.4 ±	17.9 ± 2.4†	-94.5 ± 1.7*	11.3 ±	-93.6 ± 2.7*	13.0 ± 0.7*
	1.5†	(n=8)	(n=11)	1.1*†	(n=10)	(n=10)
	(n=8)			(n=11)		

260 Parameters of equation 5 fitted to the steady-state activation versus voltage measurements in
261 the WT, the D600E mutant and their co-expression with a pipette solution containing either
262 ATP+CP (Control), 1 mM 8-Br-cAMP or none of these (0cAMP). **Vha**: voltage of half
263 steady-state activation (mV); **Sa**: slope factor (mV). * p<0.05 versus WT on the same line, †
264 p<0.05 versus control.

265

266

267 **Fig. 2: Deactivation time course and E_{rev} evaluation.** **A.** Example of response of a WT
268 HCN4 current (lower panel) to *protocol 2* (upper panel). The time course of current decay
269 during the second pulse was fitted by an exponential function (see text). **B.** Time constants
270 were plotted versus voltage for WT (n=12), *D600E* mutation alone (n=12) and in
271 coexpression with the WT (n=11). **C.** Instantaneous current-voltage relation. The tail current
272 amplitude at the beginning of the second pulse was plotted versus pulse voltage. E_{rev} was

evaluated as the voltage value at the crossover with the voltage axis. Symbols and their colors have the same meaning as in Fig. 1.

The reversal voltage was analyzed by plotting current values measured at an isochronal time near the beginning of the second pulse versus voltage, to build the instantaneous current-voltage relation. The mutation did not alter the value of E_{rev} (reversal voltage: ~ -35 mV, Fig. 2C), suggesting that the mutation did not change the relative permeabilities of the channels to Na^+ and K^+ ions. The rectification properties of the channels were not altered since the current versus voltage characteristic remained almost linear (Fig. 2C).

Effects of 8-Br-cAMP

We compared the properties of HCN4-mediated currents with control pipette solution to those recorded when the intracellular cAMP binding site of HCN4 was saturated (“1 mM 8-Br-cAMP”) or in the absence of cAMP (“0cAMP”).

In the presence of 1 mM 8-Br-cAMP, the activation curves of cells in each expression condition were positively shifted as compared to control solution (+5.3 mV for WT, +5.9 mV for *D600E* and +3.9 mV for heterozygous). Thus, *V_{ha}* (Half-activation voltage) values in the presence of 8-Br-cAMP remained similar in the three conditions. However, the slope factor (*S_a*) value was larger for the WT (16.5 ± 1.7 mV with 1 mM 8-Br-cAMP versus 13.6 ± 0.9 mV with control solution), while those of the mutant alone or in coexpression remained unchanged (Fig. 3 and Table 1, line 1).

Fig. 3: Effect of 1 mM 8-Br-cAMP on the steady-state activation curve of HCN4 current.

Currents were measured (symbols) in Cos-7 cells transfected with HCN4/WT (A),

HCN4/*D600E* (B) or HCN4/*D600E*+WT (C) in the presence (red symbols and lines) or absence (black symbols and lines) of 8-Br-cAMP in the pipette solution. The continuous lines show the fit with equation 5 (see Materials and Methods). The amplitudes have been normalized by taking into account the maximal amplitude and offset resulting from the fit. The gray area in each panel delineates the region of physiological diastolic voltages of the SA node.

In the WT, absence of cAMP caused a negative shift of *V_{ha}* by 8.6 mV versus control solution, i.e.: -103.4 ± 1.5 mV versus -94.8 ± 2.4 mV (Fig. 3A and Table 1). For the mutant, alone or in coexpression with the WT, the shift of *V_{ha}* became negligible (Table 1 and Fig. 3B and C). In addition, the slope factor in the WT was slightly increased from 13.6 ± 0.9 to 16.5 ± 1.7 mV compared to the 8-Br-cAMP condition, whereas, in the heterozygous condition, it remained unchanged (14.8 ± 0.6 versus 15.1 ± 0.8 mV).

In order to evaluate the impact of elevation of cAMP over a physiological range of voltages, we used as a reference the properties of activation of the HCN4 current in the control solution, with an estimated level of 3 μ M intracellular cAMP (see S1_Appendix). We superimposed the activation curves obtained with control solution and with 1 mM intracellular 8-Br-cAMP in the heterozygous expression condition (*D600E*+WT) and in the WT (Fig. 4).

Fig. 4: Effects of saturating cAMP binding sites on the steady-state activation variable versus voltage curve in the physiological range of voltages (gray area). Comparison of cells co-expressing *D600E*+WT (continuous lines and symbols) versus cells expressing WT HCN4 (dashed lines). Black symbols and lines refer to the control condition. The red symbols and lines refer to the 1 mM 8-Br-cAMP condition.

Modelling the effects of the mutant in a SAN cell model

Using our modified version of the rabbit sino-atrial-node (SAN) cell model of Severi et al. [25] (see S1_Appendix), we investigated the consequences of the changes observed in cells coexpressing the *D600E* and the WT HCN4 channels in comparison with those expressing the WT alone. Details of the simulations are given in the S1_Appendix.

The *D600E* mutation in coexpression with the WT (named DW thereafter) induced two major effects: an acceleration of deactivation and an attenuation of the negative shift of *V_{ha}* of the steady-state activation curve as observed when cAMP was suppressed.

In the WT version of our model (WT model) we included a 1.6-fold acceleration of the *I_f* current deactivation, and this modified model was named the DW model. When comparing the output of these two models, we noted a reduction of the maximal negative *I_f* current magnitude (-13.4%) and in the firing frequency (-2.3%, see Fig. 5A and Fig. 6). Thus, accelerated deactivation caused a decrease in *I_f* availability and a slight bradycardia in the model.

Fig. 5: Model simulations: effects of accelerated deactivation and of intracellular [cAMP] changes on the action potentials (*V_m*) and on the time course of the *I_f* current (*I_f*). **A:** Compared outputs of the WT and DW models in the control condition. In **B** and **C**, in the WT model (**B**) or the DW model (**C**), with reference to the control condition (black lines), the changes in *V_m* or *I_f* caused when simulating the absence of cAMP are shown by green lines and when simulating a large stimulation of the cAMP binding site by red lines.

When simulating the effects of cAMP suppression in the WT, the I_f current was reduced by approximately 45% (versus WT control) and the firing frequency was 6.8% slower (Fig. 5B green traces versus black traces). In the DW model, simulation of the blunted negative shift in the activation curve due to cAMP removal caused only a slight decrease in the I_f current (-7.3%) and a 0.9% slowing of firing frequency (Table S2, Fig. 5C and Fig. 6). Thus, most of the I_f -related bradycardic response to cAMP suppression was blunted in the SAN cell model simulating the heterozygous *D600E* mutation.

When simulating maximal cAMP binding effect (red traces in Fig. 5B and 5C), the increase in I_f current versus control was by 47% in the WT model and by 34% in the DW model (Table S2 in the S1_Appendix and Fig. 6) and the increase in firing frequency was lower in the DW model (4.2%) than in the WT model (7.3%). Thus, in an integrated SAN cell model, the response of I_f to a large cAMP binding effect in the heterozygous mutation condition would be partly preserved, as suggested by the comparison of activation curves in Fig. 4.

Fig. 6: Recapitulation of changes in the SAN cell model response when introducing [cAMP]-related changes in the activation parameters, for the WT (black lines and squares) or the DW (red lines and circles). **A:** Changes of the maximal negative I_f magnitude (I_f max). **B:** Changes in firing frequency from the same simulations.

We also tested whether accelerated deactivation would change the response of the HCN4 current to cAMP depletion. When introducing the 1.6-fold acceleration of deactivation in the WT model in the 0cAMP condition, the I_f current was decreased by 53% (with reference to the WT control) versus 44% caused by cAMP depletion alone, and the firing frequency was further slowed down (by 8.3% versus 6.8%), see Table S2 and Fig. S4 in the S1_Appendix.

Discussion

We describe here the biophysical properties of a mutation of the HCN4 gene, *D600E*.

When *D600E* and WT subunits were co-expressed in Cos-7 cells, the current amplitude was similar to that for the WT at all voltages (Fig. 1B). Thus it is expected that the mutation, at heterozygous state, might not change the I_f current density. The mutant did not change steady-state activation (Fig. 1C) or time constant of activation (Fig. 1D), neither did it change the relative ionic permeabilities to Na^+ and K^+ ions nor the rectification properties of the fully open channels (Fig. 2C).

The D600E mutation accelerates deactivation of HCN4 channels

However, the *D600E* mutation induced a significant acceleration of the deactivation time course (Fig. 2B). Remarkably, this change was preserved when the mutant was co-expressed with the WT. This suggests that accelerated deactivation is a dominant effect of mutated subunits. Mutations *S672R* [6] and *G1097W* [27] were found to accelerate deactivation whereas *D553N* slowed down deactivation [28] and *K530N* was without effect [11]. There is no simple rationale that could explain these effects. *D553N* neighbours *D600E* in the C-linker but has an opposite effect, while *S672R*, situated within the CNBD and *G1097W* near the end of the C-terminal region, both accelerated deactivation.

It has been suggested that accelerated deactivation of I_f during the action potential could decrease the I_f current availability, thereby lowering the slope of the diastolic depolarization and causing bradycardia [7]. A 1.6-fold acceleration of deactivation was introduced into a computer model of a sino-atrial node cell [25]. Simulations in basal conditions showed that this would be responsible for a 13.4% decrease in the magnitude of I_f and hence for a 2.4% increase in the cycle length (Fig. 5A).

Effects of saturating the cAMP binding sites of HCN4 at physiological voltages

The responses of the mutant channels, the WT and the coexpressed channels to a stable analogue of cAMP were analyzed and compared. When exploring the effects of maximal stimulation of the cAMP binding site (1mM 8-Br-cAMP) in comparison with a basal state (control pipette solution) with a cAMP level estimated to 3 μ M, the steady-state activation curves appeared superposed in those three conditions (Fig. 3 and Table 1).

Thus, when exploring the effects of saturating the cAMP binding sites in a window of physiological voltages (Fig. 4, gray area), the magnitude of the change in I_f availability was partly preserved in the heterozygous expression condition (*D600E*+WT) as compared to the WT (see Results Fig. 4 and simulations Figs. 5 and 6).

Loss of the negative activation shift in the absence of cAMP

In the WT, the steady-state activation curve appeared 8 mV more negative in the absence of intracellular cAMP as compared with a basic level of intracellular cAMP (control pipette solution), as already shown in similar conditions [7]. However, this shift was absent with the mutation *D600E*, alone or in coexpression with the WT (Table 1 and Fig. 3), suggesting that the *D600E* mutant exerts a dominant negative effect on the response of the channels to cAMP suppression. Such a lack of response to cAMP suppression was shown for homomeric HCN1 channels [29].

A tetramerization of CNBD domains takes place between the C-terminal regions of HCN4 channels upon binding with cAMP [30] and relieves the autoinhibition of the HCN4 activation which expresses as a positive shift of the activation curve. One explanation for this shift to be present whenever cAMP is absent could be that a single mutated *D600E* subunit might suffice

to trigger this tetramerization independently of cAMP. Alternatively, a cAMP molecule bound during tetramer assembly in Cos-7 cells might remain trapped within the channel whenever cAMP is dialyzed away to the patch pipette, after achieving the whole-cell patch-clamp configuration. This would require an increased affinity caused by the presence of at least one mutated subunit. Such a speculation might make sense since it has been shown that the similar failure of HCN1 channels to respond to cAMP removal is precisely due to the "trapping" of cAMP into the HCN1 channel [30]. To decide between these two alternatives will require testing whether tetramers containing *D600E* subunit(s) are indeed able to trap cAMP.

Another observation is that in cells exposed to 1 mM patch-pipette 8-Br-cAMP versus cells with control pipette solution, the activation curve was shifted by 4 to 5 mV in the positive direction. This change was observed in the three conditions: WT, *D600E* and *D600E*+WT (Table 1). This is another similarity with HCN1 channels that retained a 4 mV shift in the presence of 10 μ M cAMP [29]. This small positive shift at high saturation of the cAMP binding site versus physiological levels of cAMP was attributed to a more complete saturation of the cAMP binding sites [30].

Whatever the molecular mechanism underlying the change in the response of half-activation voltage to changes in cAMP, what is changed by the mutation is the difference in half activation voltage in the absence of cAMP rather than that seen when saturating cAMP binding sites.

Our model simulations suggest that the I_f current of the SAN cells of a carrier of the *D600E* mutation might respond poorly to the reduced cellular cAMP concentration that accompanies a change of the sympatho-vagal balance towards a moderation of the heart rate. The overall effects of I_f changes on heart rate in the model were modest, which is in keeping with the normal heart rate increases and decreases in carriers of the HCN4-E695X mutation

causing truncation of the CNBD domain, that impairs responses of HCN4 to cAMP changes [8].

Among the 29 known variants of HCN4, only 6 were studied for their response to cAMP: K530N, D553N, L573X, S672R, E695X and G1097W.

In the heterozygous condition only, K530N, that is located in the C-linker region, caused a negative shift of half-activation voltage in 0cAMP and an increase in the positive shift with 10 μ M cAMP, and additionally slowed down deactivation [11]. These effects are opposite to the ones that we describe here for *D600E*. The other single-residue mutation situated in the C-linker, D553N, caused a decrease in current density, accelerated activation and slowed deactivation without any change in half-activation voltage or in its response to elevation in cAMP as induced by IBMX [28]. The two mutations that cause truncation of the cNBD region, L573X [7] and E695X [8], induced a dominant negative loss of the positive shift of the activation curve in the presence of 1 mM 8-Br-cAMP [7] or 10 μ M cAMP [8]. In both cases, the half-activation voltage remained as negative as in the WT without cAMP. This effect is opposite to what we observed with the *D600E* mutation. The single-residue mutation within the cNBD, D672R [6], accelerates deactivation but does not alter the negative shift of V_{half} in the absence of cAMP. Finally, the C-terminal G1097W [27] mutation, when expressed homo- or heterozygously, caused a 50% reduced current, a negative shift of activation and accelerated deactivation [27]. The homotetrameric mutant channels had unchanged response to cAMP changes.

Thus, the *D600E* mutation displays powerful dominant negative suppression of the response to the absence of cAMP, causing the half activation voltage to remain positively shifted, as observed in the WT HCN4 channel when its cAMP binding site is occupied. This behavior has not been reported for any of the mutants studied for their effect on the modulation of HCN4 channel properties by cAMP.

The significant changes in channel properties caused by the *D600E* mutation are brought about by a change in a single aminoacid residue from an aspartic acid to a glutamic acid. Further, this change is limited to the lengthening of the side chain of the residue by a single carbon bond whereas the terminal group OH-CH-COO⁻ remains unchanged. Remarkably, this minor change causes a profound modification of the response of the channel to cAMP depletion, as much as does HCN1 versus HCN4, which involves more than 15 differences in AA residues within the CNBD region. Lastly, the D residue at position 600 has not been considered to take part to the cAMP binding site in 3D cAMP docking models of HCN4 [5,31,32].

Future experimental and docking model studies of the role of residue D600 might bring novel insight into the cyclic nucleotide modulation of HCN4 channel gating.

Limitations of the study

We tested the changes in the biophysical properties of the HCN4 current due to the *D600E* mutation alone or in coexpression with the WT HCN4 in Cos-7 cells. The properties derived in this context might differ if we used another cell line.

The comparison of the detailed biophysical properties derived in the present study with published data ought to take into account that we worked at a temperature of 22 ± 1 °C and that we used hyperpolarizing pulses of 5 seconds to activate the HCN4 current, causing incomplete activation with small hyperpolarizations [23]. However, this should not hinder comparisons of data within the present study, since protocols and temperature were the same for all cells studied.

When extrapolating the physiological consequences of the *D600E* mutation, we ought to take into account that the physiological I_f channels in man are likely made up of HCN4 and HCN1 subunits, since the human sinus-node expresses about 80% HCN4 and 20% HCN1

mRNAs [2]. Effects of the mutation on the response to changes in cAMP in such a context will include possible interactions of *D600E* mutated HCN4 with HCN1 that itself has compromised response to cAMP depletion. There is no rationale to evaluate how different the final effect of the mutations would be in the real context of a human sino-atrial cell. For example, transfection of HEK 293 cells with equimolecular amounts of rabbit HCN1 and HCN4 cDNAs yields whole cell current properties that are not predictable by an arithmetic combination of subunit properties and that largely differ from those of the I_f current in rabbit SAN cells [33]. The particular environment of I_f channels in human SAN cells may also contribute to alter the consequences of the *D600E* mutation in an unpredictable manner.

Conclusions

The large negative shift caused in HCN4 channels when intracellular cAMP is absent is abolished by mutation *D600E*. In addition, channel deactivation in basal conditions is accelerated. Both are dominant effects of *D600E* subunit(s) within HCN4 tetramers and result from a minor change: the lengthening by one carbon bond of the side chain of AA residue at position 600, without change in the terminal OH-CH-COO⁻ functional group. This is an unprecedented effect that deserves further investigation, which might reveal novel mechanism of modulation of cAMP effects, since this residue is located outside of the canonical cAMP binding site of the HCN4 channel.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Yves Tourneur for sharing the cell culture facility of the Centre Commun de Quantimétrie of the Université Claude Bernard Lyon 1 and to Professor

516 Charles Dumontet for hosting cell lines. The authors thank Pr. Patrick Bois for critical reading
517 of the manuscript and helpful suggestions. The help of Sophie Moulin (Bachelor Degree) for a
518 few experiments and of Elisabeth Bratton for editing the English are acknowledged. Thanks
519 go to Karine Drapeau for her technical assistance.

520 A partial account of the present results has been reported to the Physiology2014 meeting in
521 London, 30th June to 2nd July 2014, as an oral communication [34].

522

523

524 **References**

525

526

527 1. DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the
528 hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. J
529 Physiol 377: 61-88.

530 2. Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P et al. (2009)
531 Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac
532 pacemaker. Circulation 119: 1562-1575.

533 3. DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by
534 intracellular cyclic AMP. Nature 351: 145-147.

535 4. Baruscotti M, Bottelli G, Milanesi R, DiFrancesco JC, DiFrancesco D (2010) HCN-
536 related channelopathies. Pflugers Arch 460: 405-415.

537 5. Xu X, Vysotskaya ZV, Liu Q, Zhou L (2010) Structural basis for the cAMP-dependent
538 gating in the human HCN4 channel. J Biol Chem 285: 37082-37091.

539 6. Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscone T, DiFrancesco D (2006) Familial sinus
540 bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. N Engl J Med
541 354: 151-157.

- 542 7. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O et al. (2003)
543 Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 111:
544 1537-1545.
- 545 8. Schweizer PA, Duhme N, Thomas D, Becker R, Zehelein J, Draguhn A et al. (2010)
546 cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not
547 critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3: 542-552.
- 548 9. Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H et al. (2007) Point mutation
549 in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional
550 expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* 116:
551 463-470.
- 552 10. Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, Marek-Yagel D, Pras E, Dascal N et al. (2010) A
553 novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in moroccan
554 jews. *J Cardiovasc Electrophysiol* 21: 1365-1372.
- 555 11. Duhme N, Schweizer PA, Thomas D, Becker R, Schroter J, Barends TR et al. (2013)
556 Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-
557 bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 34: 2768-2775.
- 558 12. Macri V, Mahida SN, Zhang ML, Sinner MF, Dolmatova EV, Tucker NR et al. (2014)
559 Novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial
560 fibrillation. *Heart Rhythm* 11: 1055-1062.
- 561 13. Verkerk AO, Wilders R (2014) Pacemaker activity of the human sinoatrial node: effects
562 of HCN4 mutations on the hyperpolarization-activated current. *Europace* 16: 384-395.

14. Verkerk AO, Wilders R (2015) Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current. *Int J Mol Sci* 16: 3071-3094.
15. Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88: 919-982.
16. Li YD, Hong YF, Zhang Y, Zhou XH, Ji YT, Li HL et al. (2014) Association between reversal in the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel and age-related atrial fibrillation. *Med Sci Monit* 20: 2292-2297.
17. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A et al. (2004) The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British Journal of Cancer* 91: 355-358.
18. Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-182.
19. Christé G, Thériault O, Chahine M, Millat G, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R et al. (2008) A new C-terminal HERG mutation A915fs+47X associated with symptomatic LQT2 and auditory-trigger syncope. *Heart Rhythm* 5: 1577-1586.
20. Huang H, Priori SG, Napolitano C, O'Leary ME, Chahine M (2011) Y1767C, a novel SCN5A mutation, induces a persistent Na⁺ current and potentiates ranolazine inhibition of Nav1.5 channels. *Am J Physiol* 300: H288-H299.
21. Reuter H, Scholz H (1977) A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 264: 17-47.

- 585 22. Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R (1994) A practical guide to the preparation of Ca²⁺
586 buffers. *Meth Cell Biol* 40: 3-29.
- 587 23. Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular
588 characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel
589 predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:
590 9391-9396.
- 591 24. Moller S, Alfieri A, Bertinetti D, Aquila M, Schwede F, Lolicato M et al. (2014) Cyclic
592 nucleotide mapping of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN)
593 channels. *ACS Chem Biol* 9: 1128-1137.
- 594 25. Severi S, Fantini M, Charawi LA, DiFrancesco D (2012) An updated computational
595 model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate
596 modulation. *J Physiol* 590.18: 4483-4499.
- 597 26. Garny A, Noble D, Hunter PJ, Kohl P (2009) CELLULAR OPEN RESOURCE (COR):
598 current status and future directions. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 367: 1885-
599 1905.
- 600 27. Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H et al. (2014) A
601 Novel HCN4 Mutation, G1097W, Is Associated With Atrioventricular Block. *Circ J* 78:
602 938-942.
- 603 28. Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T et al. (2004)
604 Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N,
605 associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem* 279: 27194-27198.

29. Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117: 491-504.
30. Lolicato M, Nardini M, Gazzarrini S, Moller S, Bertinetti D, Herberg FW et al. (2011) Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 286: 44811-44820.
31. Lolicato M, Bucchi A, Arrigoni C, Zucca S, Nardini M, Schroeder I et al. (2014) Cyclic dinucleotides bind the C-linker of HCN4 to control channel cAMP responsiveness. *Nat Chem Biol* 10: 457-462.
32. Xu X, Marni F, Wu S, Su Z, Musayev F, Shrestha S et al. (2012) Local and global interpretations of a disease-causing mutation near the ligand entry path in hyperpolarization-activated cAMP-gated channel. *Structure* 20: 2116-2123.
33. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C et al. (2003) Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549: 347-359.
34. Vincent Y, Chahine M, Mechakra A, Chevalier P, Yang YQ, Christé G (2014) Pathogenic mechanisms of two novel mutations of the hyperpolarization activated channel type 4 gene related to lone atrial fibrillation. *Proc Physiol Soc* 31: C10.

Figure 1
[Click here to download Figure: Fig1.tif](#)

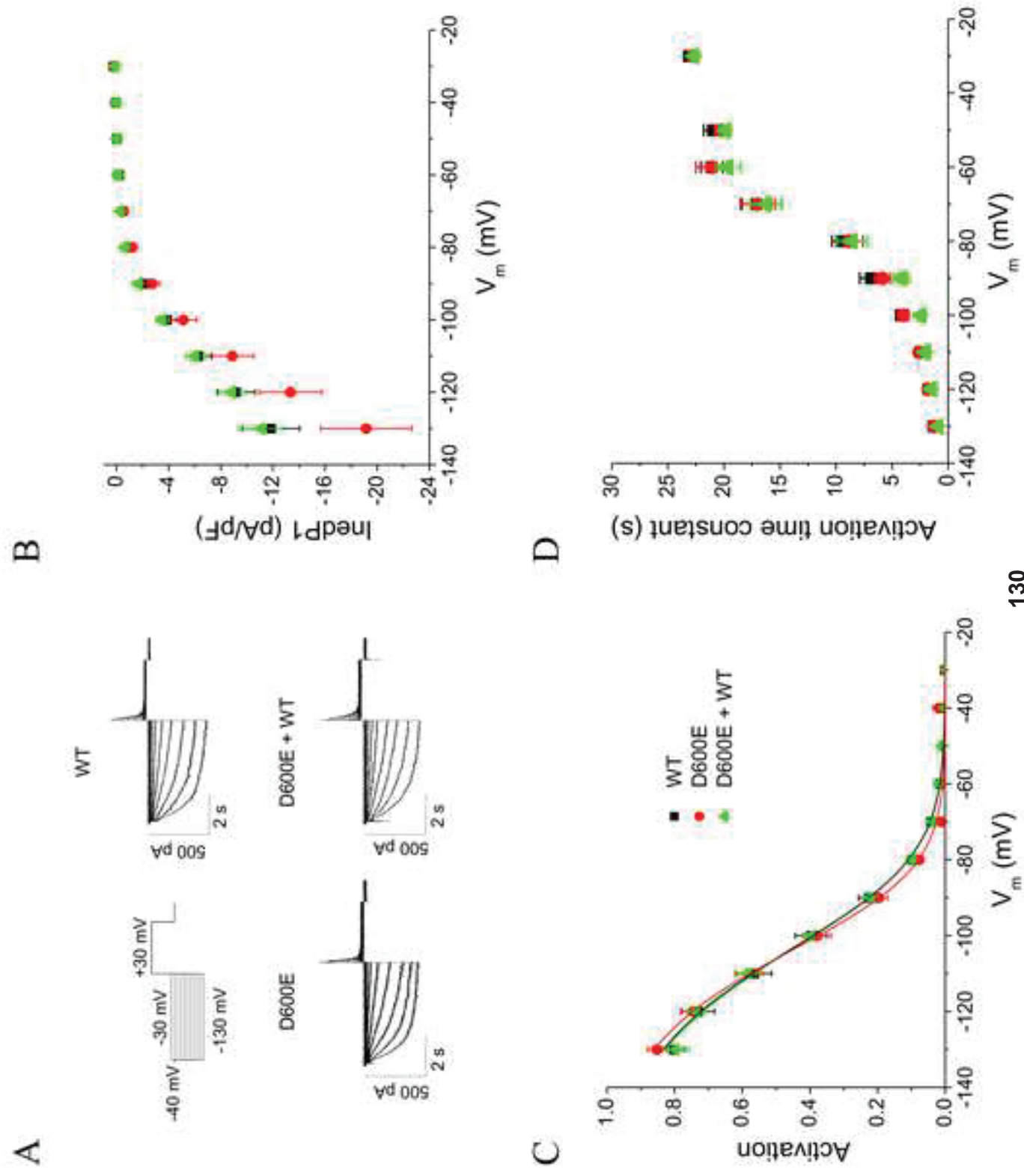


Figure 2
[Click here to download Figure: Fig2.tif](#)

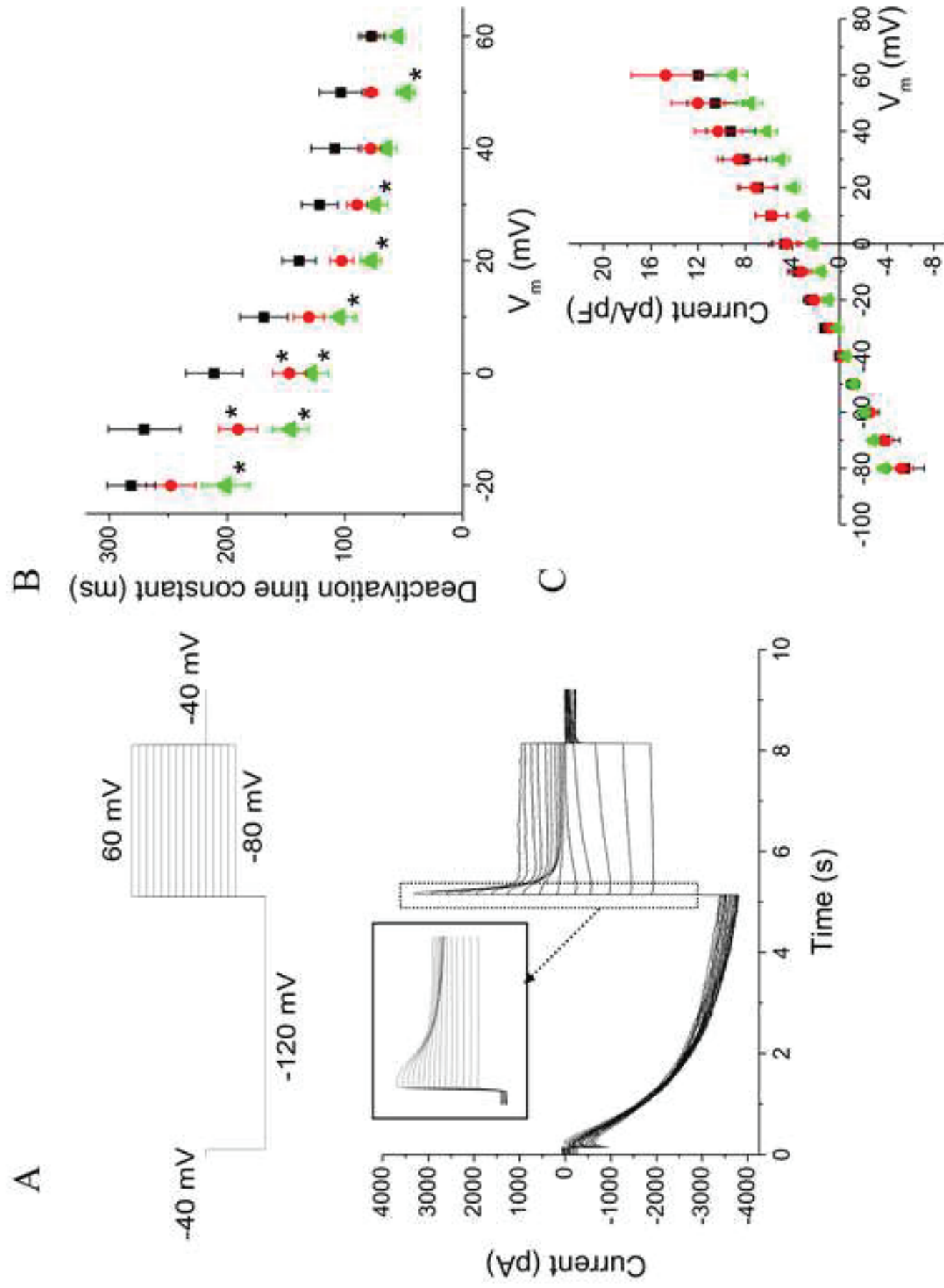


Figure 3
Click here to download Figure: Fig3.tif

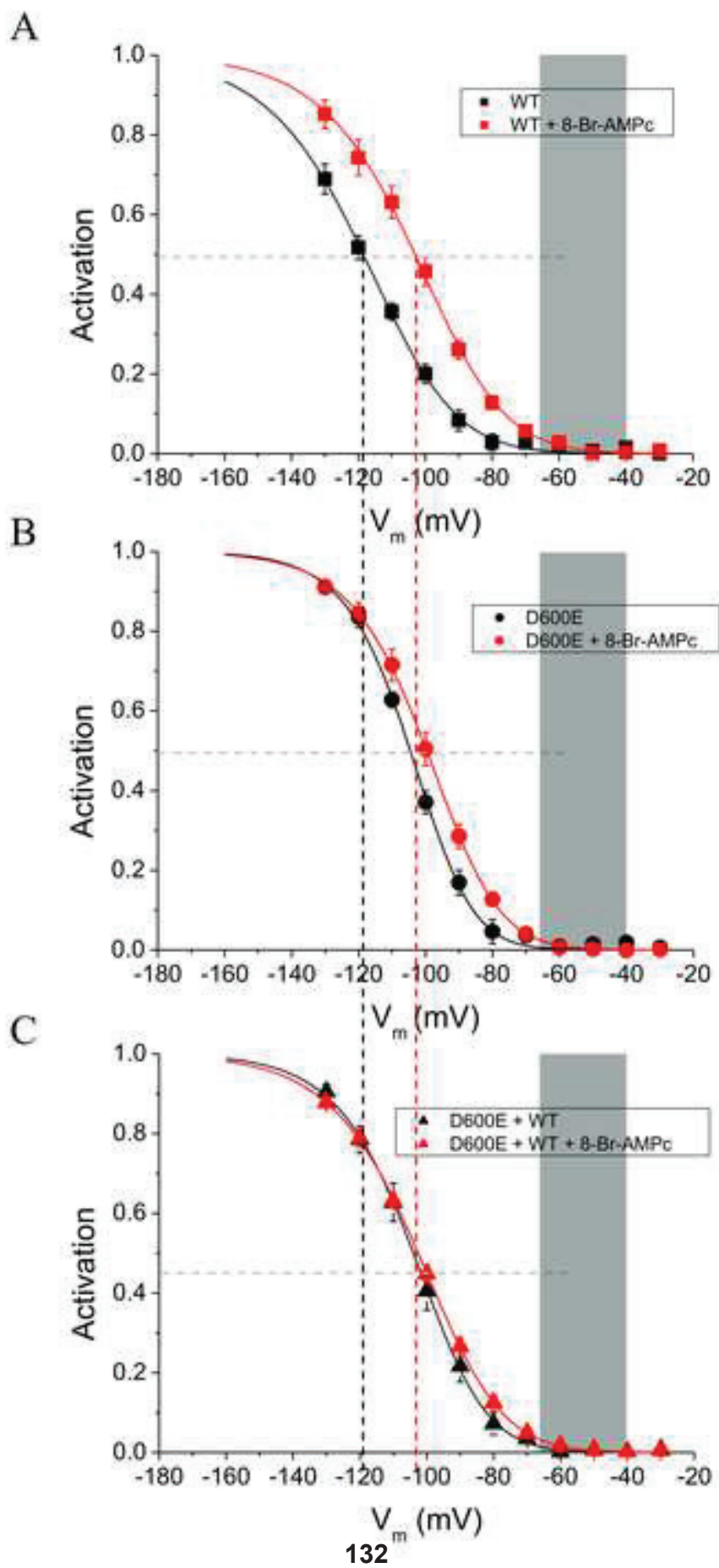


Figure 4
[Click here to download Figure: Fig4.tif](#)

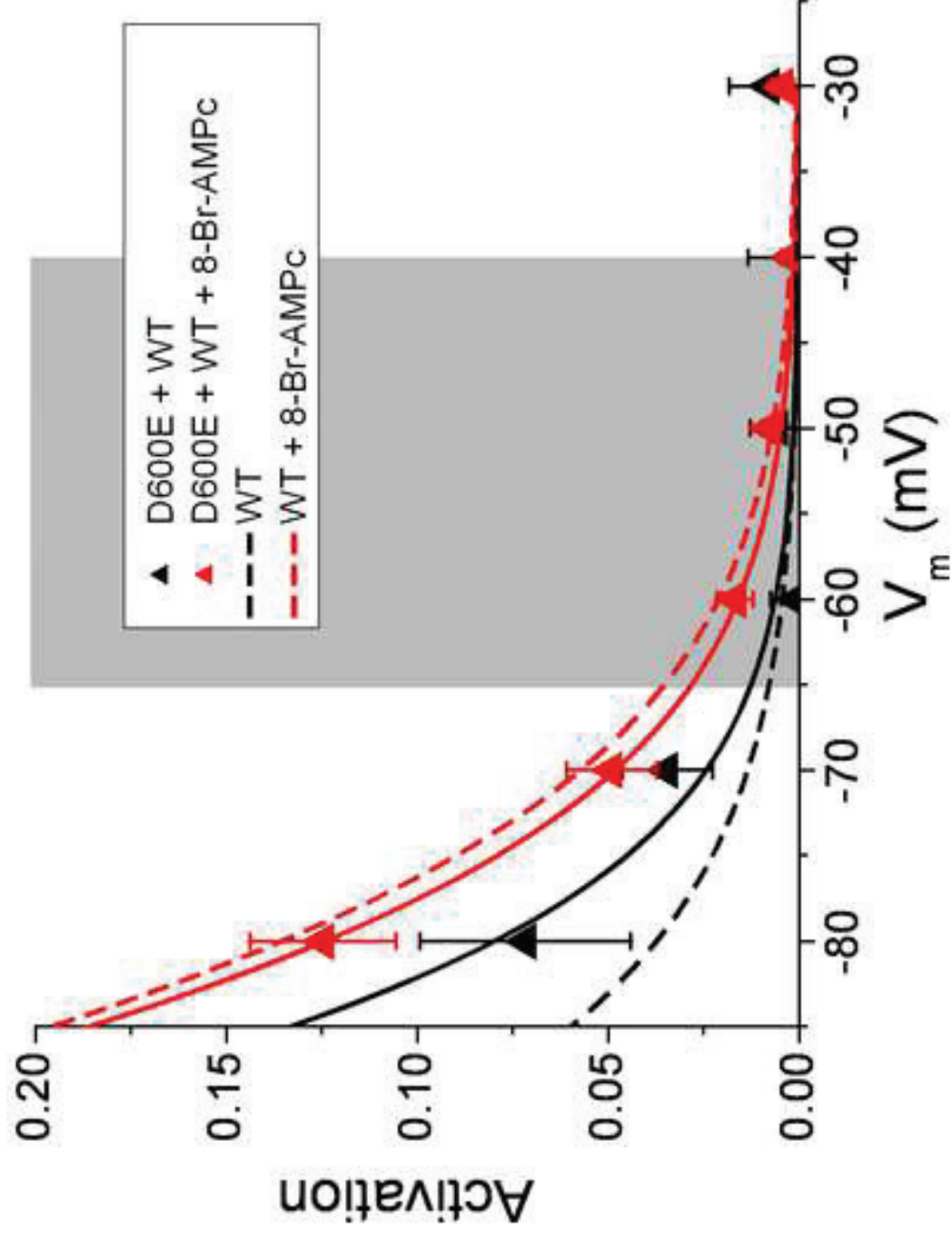


Figure 5
Click here to download Figure: Fig5.tif

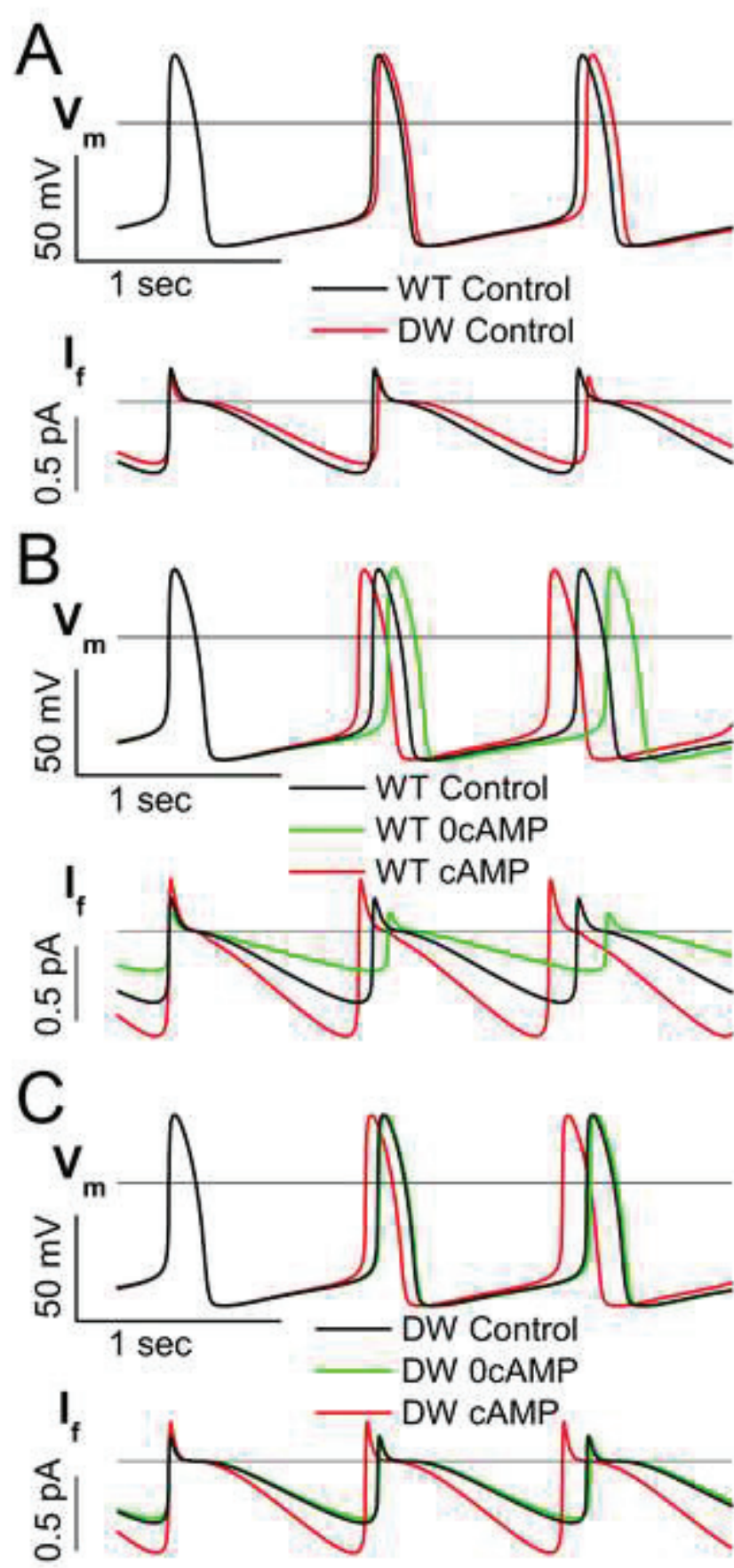
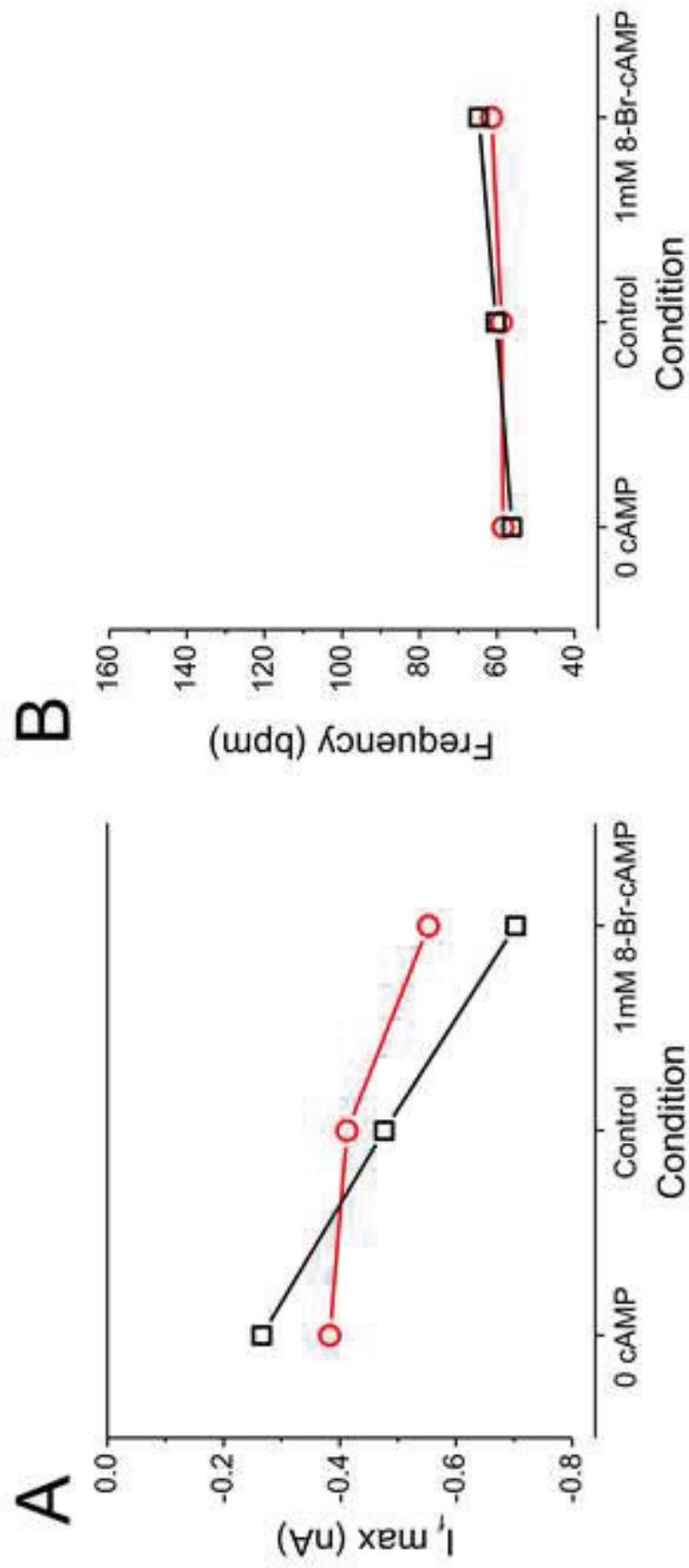


Figure 6
[Click here to download Figure: Fig6.tif](#)



1 **Online Supplementary Data**

2

3 **The minor amino acid change *D600E* reduces the response of**
4 **HCN4 channels to cAMP suppression and accelerates**
5 **deactivation**

6

7 Yohann Vincent, Asma Mechakra, Yi-Qing Yang, Mohamed Chahine,
8 Philippe Chevalier, Georges Christé

9

10

11

11 **Supplementary Materials and Methods**

12 **Modelling of the SAN cell electrical activity**

13 The sino-atrial cell computer model of Severi et al. [1] was run under the COR environment
14 [2] in Windows XP. A few changes were introduced from the original version, as described below.
15 The model was run in 0-current clamping condition in its initial settings and after every change
16 until a dynamic steady state was reached.

18 **Time constants of activation and deactivation of I_f**

19 The time constants of I_f activation and deactivation were reformulated to reproduce the
20 shape of their voltage dependence as obtained from our experiments on HCN4 channels in Cos-7
21 cells (Fig. 1D and Fig. 2B in main text).

22 There are strong arguments for separate actions of mutations on activation and deactivation.
23 Mutation K530N in HCN4 caused accelerated activation but did not alter deactivation time course
24 [3]. On the contrary, the S672R mutation shortened deactivation time constant but left activation
25 kinetics unchanged [4]. In a variant of HCN4, high levels of cAMP caused a ~3 fold faster
26 activation, whereas not altering deactivation kinetics [5]. A notion of separated pathways is also
27 included into the kinetic scheme of the allosteric model of Altomare et al. [6]. Therefore, we used
28 separate functions to represent the voltage dependence of activation time constants and of
29 deactivation time constants.

30 The following equations [7] were fitted to our experimental data sets for the time constants
31 of activation and of deactivation (Fig. S1). We assumed that the time constants of activation would

level up at a value of 20 sec at voltages positive to +50 mV, and that deactivation time constants would level up at a value of 1 sec at voltages negative to -80 mV.

The functions that best fit these data sets were respectively:

Activation time constant versus voltage:

$$\tau_{a(V)} = Aai + 0.5 * 1000 / \left(Apa * (V + Apb) / (e^{(Apc * (V + Apb))} - 1) + Apd * (V + Ape) / (1 - e^{(-Apf * (V + Ape))}) \right)$$

with

$$Aai = -2598.4; Apa = 0.00402; Apb = 73.681; Apc = 0.181; Apd = -9e-5; Ape = 976; Apf = -0.00123;$$

Deactivation time constant versus voltage:

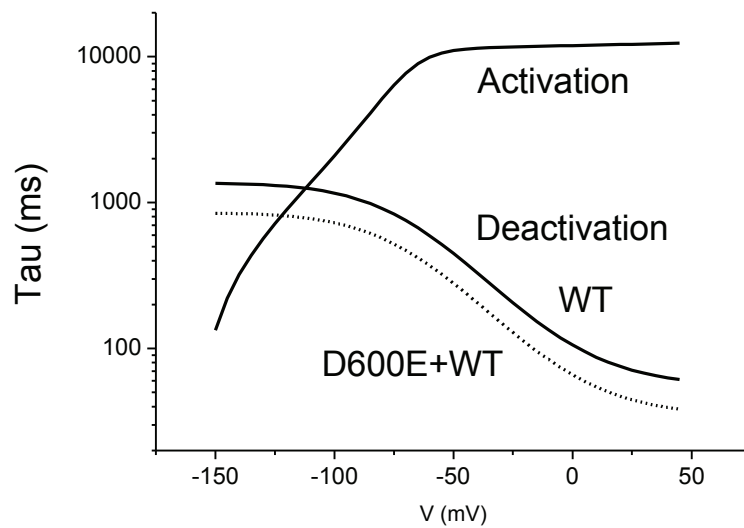
$$\tau_{d(V)} = Dai + 0.5 * 1000 / \left(Dpa * (V + Dpb) / (e^{(Dpc * (V + Dpb))} - 1) + Dpd * (V + Dpe) / (1 - e^{(-Dpf * (V + Dpe))}) \right)$$

with

$$Dai = 109.7; Dpa = 0.0125; Dpb = 5855; Dpc = 0.00092; Dpd = 7037495; Dpe = -398; Dpf = 0.049;$$

We applied a scaling factor 0.5 to both of these time constants, to take into account the effect of temperature (our measurements were done at room temperature: 22±1°C).

Fig. S1: Graphs of the separate functions used for time constants of activation and deactivation.



Data are plotted as $\log_{10}(\text{Tau})$ versus voltage (black continuous lines). A reduction of the deactivation time constant by a factor 1.6 (dotted line) accounted for the acceleration of deactivation caused by the mutation D600E (Fig. 2B in main text).

Accelerated deactivation with mutation D600E

To account for the shortening of the time constant of deactivation caused by mutation D600E alone or in coexpression with the WT, we applied a reduction factor of 1.6 to function Dtauy (dotted line in Fig. S1).

Steady-state activation variable versus voltage

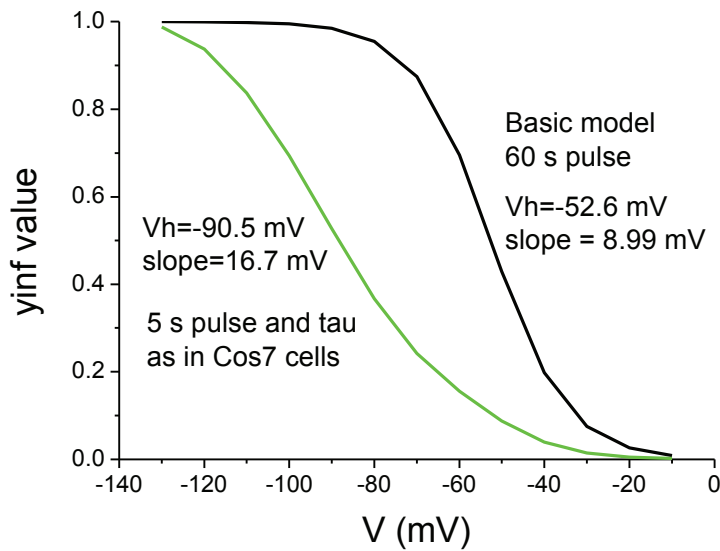
In the model of Severi et al., the steady-state activation variable y_{inf} is defined by the following equation:

$$y_{inf}(V_m) = 1/(1 + e^{(V_m - V_h)/S})$$

where V_h is the voltage at which y_{inf} is equal to 0.5 and S is the slope factor.

The initial values of V_h and S in the model of Severi et al. [1] were set at -52.5 mV and 9 mV respectively. It is well established that the estimation of SS activation parameters is strongly dependent on the duration of the conditioning pulse used [8,9]. We applied voltage clamp protocols in the model to measure the voltage dependency of the activation variable y_{inf} . Expectedly, when using conditioning pulses of 60 s duration, values of $V_h = -52.6$ mV and $S = 8.99$ mV were found, very close to the parameters specified in the basic model. When applying 5-second pulses as in our experiments, and using the time constant functions fitted to the values found in our experiments, the analysis of tail currents yielded a V_h value of -90.5 mV and a S of 16.7 mV. These values are close to our experimental values of $V_h = -91.1$ mV and $S = 13.6$ mV in the WT (Fig. 2B, Fig. 4A and Table 1 in the main text). We did not attempt to further adjust these parameters.

Fig. S2: Model simulation of our voltage-clamp experiments.



93 The black line shows the SS activation versus voltage curve as implemented in the basic model.
94 The green line is the SS activation curve reconstructed by applying the activation measuring
95 protocol (as in Fig. 1 of main text).

96

97 When 5 sec pulses were applied to the model using the same time constants of activation
98 and deactivation as found in our experiments, the model yielded values similar to the ones that we
99 measured in Cos-7 cells transfected with the WT HCN4.

100 Final adjustment

101 When testing the model in free-running I-clamp mode, we found a large and durable
102 hyperpolarization at the beginning of diastole. Reduction of the I_{Kr} current conductance (parameter
103 " g_{Kr} ") from 2.1637 to 1.6 nS cancelled this phenomenon (not shown).

104 We verified that suppression of the I_f current in the model caused an increase in the cycle
105 length by 18% (Fig. S3), i.e. a 15% decrease in frequency of firing, which is lower than the 20%
106 decrease in frequency observed by Verkerk et al. [10] in isolated human SAN cells upon blocking I_f
107 with 2 mM CsCl.

108

109 **Fig. S3: Action potentials in the WT model.**

110

111

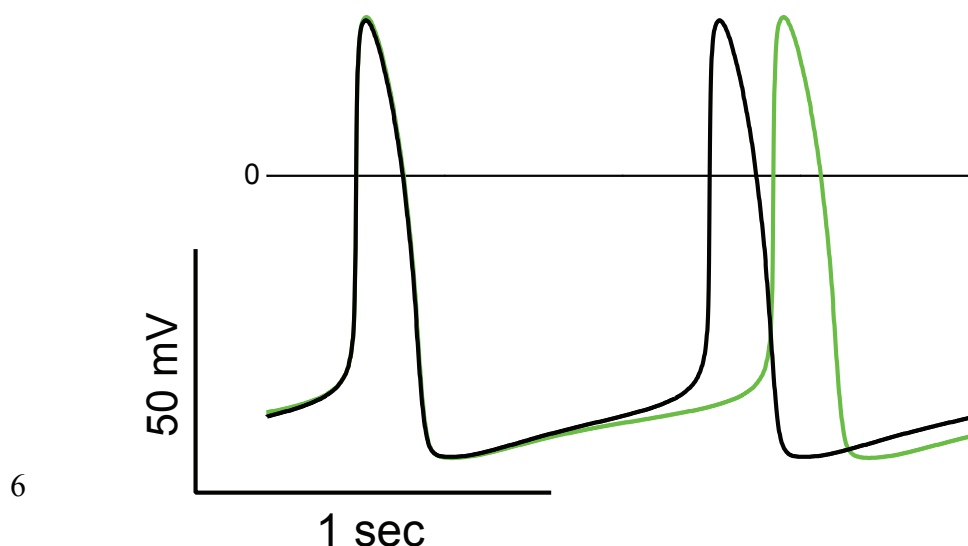
112

113

114

115

116



6

117
118
119
120
121
122
123
124
125
126

127

128

129

130
131
132
133
134
135
136
137
138
139

The basic cycle length of the model in basal condition (black line) was at 995 ms and suppression of I_f (green line) caused a 17.8% increase to 1172 ms.

The model so defined was taken to represent a SAN cell of a control individual, and was called WT, as it is based on the properties of the WT HCN4, as defined experimentally. We introduced a 1.6-fold accelerated deactivation as depicted above, this second model was called DW and ought to correspond to the heterozygous condition of the mutation as found in the carrier.

Supplementary results

Mutation effects introduced in the model

It was assumed that properties of WT HCN4 observed in cells when the pipette contained physiological concentrations of ATP and CP (control solution) would represent the basal situation of a SAN cell, without excitation or moderation of the autonomic nervous system. In control solution, 62% of the full V_h shift from 0 to 1 mM 8-Br-cAMP was achieved in the WT. According to the dose-response of HCN4 channel to cAMP in excised patches [4], this would correspond to about 3 μ M intracellular cAMP present in our cells dialysed with the control solution. Properties of HCN4 current in cells transfected in the WT or DW condition with control solution were taken as a reference.

To test in the model the influence of cAMP concentrations on the activation curve, we computed the amplitude of the experimental V_h shifts from the V_h value found in control solution

140 and applied an identical shift to the V_h value of -52.5 mV in the model. Regarding changes in the
 141 slope factor, we computed the relative change in value versus the value found for control solution
 142 and applied it to the slope factor value of 9 mV in the model. The same was done for the WT and
 143 for the DW series.

144 Table S1 shows the values applied in the model to test the functional changes related to the
 145 effects of the mutation on the steady-state activation curve with or without intracellular 8-Br-
 146 cAMP.

147

148

149 **Table S1: Parameters of the activation variable at steady-state**

Conditions	V_h in model	S in model
<i>WT 0cAMP</i>	-61.1	11.9
<i>WT control</i>	-52.5	9.0
<i>WT cAMP</i>	-47.2	10.9
<i>DW 0cAMP</i>	-53.0	7.9
<i>DW control</i>	-52.5	9.0
<i>DW cAMP</i>	-48.6	9.2

150

151 Parameters of the activation variable at steady-state as introduced into the model. DW refers to the
 152 co-expression of D600E and WT HCN4 in Cos-7 cells.

153

154

155 **Tests of D600E effects in the heterozygous condition with reference** 156 **to the WT**

157 Since there was not significant differences in activation curve parameters between the *DW*
 158 control and the *WT* control conditions (Table 1 in main text), identical values of V_h and slope were

assumed in the model for those two conditions (Table S1). They were set as a representation of the basal state with intracellular ATP+CP, that would cause a [cAMP] around 3 μ M. Changes in parameters of the activation curve upon removal of cAMP (Table S1), proper to either the WT or the DW conditions were introduced into the WT and DW models that were run to reach a dynamic steady-state (about 600 s). Values of the cycle length and of the maximum of the negative surge of I_f during diastole were collected from the output of each model trial and changes were computed with reference to the corresponding values in the control condition. All values are reported in Table S2 (see legend). Absolute values of I_f and frequency were plotted in the graphs of Fig. 5 in the main text.

In the WT, the response of the I_f current to 0cAMP was rather large (-44%), whereas the resulting decrease in firing frequency was low (-6.8%). This is in line with the mere 16% decrease in firing frequency with total I_f suppression in the model (Fig. S3). Expectedly, the blunted shift of activation curve in the DW under 0cAMP resulted in only 7.3% decrease in I_f and less than 1% slowing of firing frequency.

Table S2: Values of I_f magnitude ($I_f max$) and cycle length (CL) at steady-state in the model.

Conditions tested in model	$I_f max$ (pA)	I_f Change (%)	CL (ms)	frequency (bpm)	freq. Change (%)
<i>WT 0cAMP</i>	-0.266	-44.2 ^a	1068	56.2	-6.8 ^a
<i>WT control</i>	-0.477	--	995	60.3	--
<i>WT cAMP</i>	-0.703	47.4 ^a	927	64.7	7.3 ^a
<i>DW 0cAMP</i>	-0.383	-7.3 ^b	1028	58.4	-0.9 ^b
<i>DW control</i>	-0.413	-13.4 ^a	1019	58.9	-2.3 ^a
<i>DW cAMP</i>	-0.553	33.9 ^b	977	61.4	4.2 ^b
<i>WT 0cAMP+ Deac</i>	-0.224	-53.0 ^a	1085	55.3	-8.29 ^a

Values of I_f magnitude ($I_f max$) and cycle length (CL) at steady-state in the model when changes in parameters of activation reproduced the behaviour of WT HCN4 in the control solution (*WT*

178 *control*), with 1 mM 8-Br-cAMP (*WT cAMP*) and in the absence of cAMP (*WT 0cAMP*). The same
179 was done to reproduce the changes in activation curve of the heterozygously expressed D600E
180 mutated HCN4. Frequency of beating (*frequency*) was computed in beats per minute (bpm) as
181 $60000/CL$. Changes in I_f max (*I_f Change*) and in frequency (*freq. Change*) were computed in %
182 with reference to *WT control* (^a) or to *DW control* (^b).

183

184 Accelerated deactivation was the only change introduced in the *WT control* model to yield
185 the *DW control* model. It caused a reduction in I_f by 13%. This is recalling the open-state
186 accumulation of Kv1qt1/MinK potassium current due to slow deactivation kinetics [11] and may
187 underlie a mechanism of modulation of the rate of firing related to changes in the time constant of
188 deactivation, independently from possible changes in the steady-state activation curve or in the time
189 constant of activation.

190

191 In the WT, an additional decrease in I_f and frequency is seen when deactivation is
192 accelerated 1.6-fold in the 0cAMP condition (compare *WT 0cAMP+ Deac* versus *WT 0cAMP* in
193 Fig. S4 and see analysis in Table S2). This suggests that, in the DW condition, if the mutation had
194 not suppressed the response of the I_f current to the decrease of cAMP, the I_f -related bradycardia
195 under strong cardiac cholinergic stimulation could have been enhanced. This effect would however
196 have little impact since the modulation of heart rhythm due to I_f variations accounts for less than
197 18% change in firing frequency (see above).

198

199

200

201

202

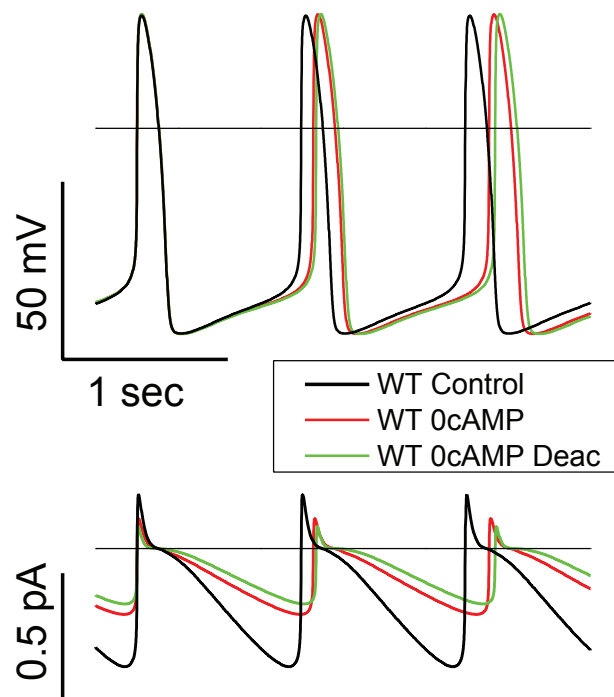


Fig. S4: Time course of V_m and I_f in the WT model

Time course of V_m and I_f in the WT model run in the control condition (black lines), then under 0cAMP condition (red lines) and then with further addition of a 1.6-fold accelerated deactivation (green lines). Analysis of output data is reported in Table S2.

220 **Supplementary References**

- 221 1. Severi S, Fantini M, Charawi LA, DiFrancesco D (2012) An updated computational model of
222 rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. *J*
223 *Physiol* 590.18: 4483-4499.
- 224 2. Garny A, Noble D, Hunter PJ, Kohl P (2009) CELLULAR OPEN RESOURCE (COR):
225 current status and future directions. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 367: 1885-1905.
- 226 3. Duhme N, Schweizer PA, Thomas D, Becker R, Schroter J, Barends TR, Schlichting I,
227 Draguhn A, Bruehl C, Katus HA, Koenen M (2013) Altered HCN4 channel C-linker
228 interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial
229 fibrillation. *Eur Heart J* 34: 2768-2775.
- 230 4. Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscone T, DiFrancesco D (2006) Familial sinus
231 bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* 354:
232 151-157.
- 233 5. Liu H, Aldrich RW (2011) Tissue-specific N terminus of the HCN4 channel affects channel
234 activation. *J Biol Chem* 286: 14209-14214.
- 235 6. Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D
236 (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 117:
237 519-532.
- 238 7. Verkerk AO, Wilders R (2010) Relative importance of funny current in human versus rabbit
239 sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 48: 799-801.
- 240 8. Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular
241 characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly
242 expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9391-9396.
- 243 9. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D (2003)
244 Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 111: 1537-
245 1545.

- 246 10. Verkerk AO, Wilders R, van Borren MM, Peters RJ, Broekhuis E, Lam K, Coronel R, de
247 Bakker JM, Tan HL (2007) Pacemaker current ($I(f)$) in the human sinoatrial node. *Eur Heart J*
248 28: 2472-2478.
- 249 11. Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J, Lazdunski M (1997)
250 Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1
251 channel activity. *J Biol Chem* 272: 16713-16716.
252
253

A concern may be raised regarding the validity of the analysis of steady-state activation versus voltage relationship by fitting a Boltzmann function to a dataset, when the dataset does not show maximal values of current activation.

The function that we use to fit steady-state activation versus voltage measurements of the HCN4 current is a squared Boltzmann function:

$$I(V_m) = I_{max}/(1 + e^{(V_m - V_{ha})/S_a})^2 + Offset \quad (\text{Equation 1})$$

Where V_{ha} is the voltage at which the function shows half of its maximal variation, currently called V_{half} . S_a is a parameter governing the slope of the function at $V_m = V_{ha}$. The additional parameter **Offset** is included to account for the presence of a constant offset on the measurement of currents.

The analysis is exemplified in figure S1 where a typical dataset from a cell was fitted. It clearly appears that the maximal value of measured current was 14 nA at -130 mV, whereas the maximum of current of the fitting curve was 19.4 nA. Therefore the dataset does not include the "plateau" values that would have been nearly reached if we had applied hyperpolarizations as negative as -200 mV. In fact, in this example, the value of current at the most negative voltage explored (-130 mV) was 28% lower than the maximum of the fitting curve.

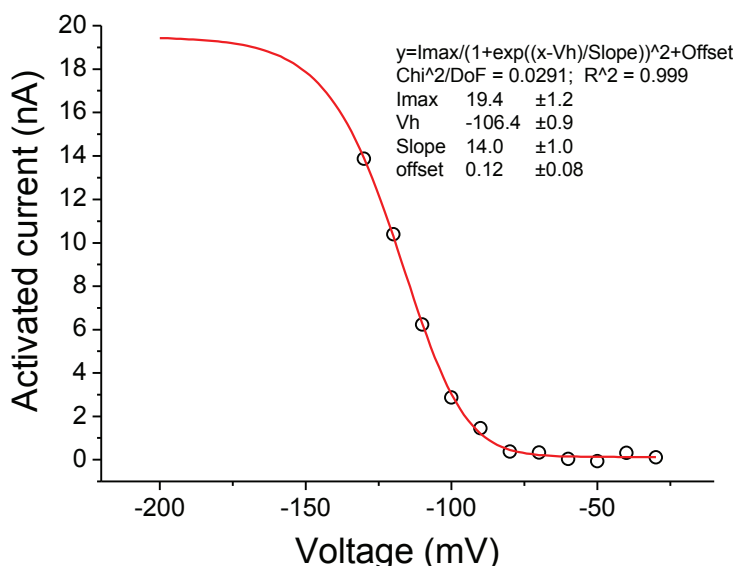


Figure S1: Example of a fit of equation 1 to a steady-state activation versus voltage relationship. Note that the 11 data points do not document the maximally activated current. The value of current at the most negative value of voltage applied in experiments (-130 mV) was 28% less than the maximum of the fitting curve.

Error in HCN4 current measurements.

Measurements of steady state HCN4 current activation versus voltage from 20 separate cells were each fitted with equation 1.

The residuals between data and theoretical function from each of these 20 fits were collected into a single dataset of 11 x 20=220 values that was analyzed for its distribution: the histogram of these values is shown in figure S2.

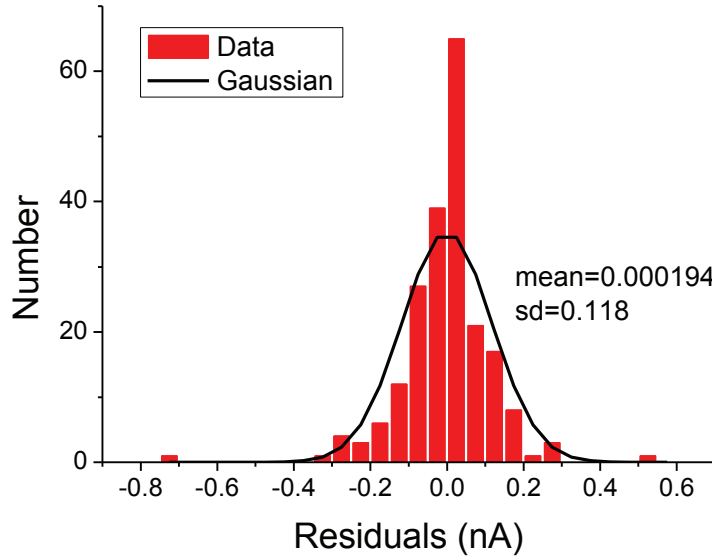


Figure S2. Distribution of the residuals around the fitted squared Boltzmann function using data from 20 cells (220 data points). The Gaussian distribution with the same mean, standard deviation and total population as the dataset is shown as a solid line.

It appears that the histogram is centered on the zero value and is reasonably accounted for by a gaussian distribution. This means that our fitting function is appropriate to describe the voltage dependence of the activated current. Thus the differences between data and fitting function may be assigned to current measurement error with a standard deviation of 0.118 nA.

We used this value in the following simulations.

Is the lack of representation of the maximally activated current compromising evaluation of the parameters of the fitting function?

To answer this question, we generated sets of artificial HCN4 steady-state activation versus voltage in the range -30 to -130 or -30 to -200 mV and compared the accuracy of the evaluation of parameters of the Boltzmann function fit to these artificial datasets. To generate artificial data, we used the function:

$$I_{(V_m)} = I_{max} / (1 + e^{(V_m - V_{ha}) / S_a})^2, \quad (\text{Equation 2})$$

The values for $V_{ha} = -103.4$ mV and $S_a = 18$ mV were chosen since they correspond to the most unfavorable of our data sets (WT without cAMP, see table 1 in the manuscript), in which the lack of representation of the maximum of activation was the most prominent. In fact with the above values of V_{ha} and S_a , the current value at -130 mV is only 66% of the maximal theoretical value of the function.

A set of 100 values of theoretical $I_{(-130 \text{ mV})}$ values was generated along a distribution function closely reproducing the observed distribution of the $I_{(-130 \text{ mV})}$ values in our cells transfected with WT HCN4. These values were then scaled using the value of the function at -130 mV (0.663) to yield the theoretical fully activated current I_{max} .

For each of these I_{max} values, a theoretical activation curve was computed with equation 2 for a set of V_m voltage values. We replicated this curve 30 times and random error was added to each individual data point using a gaussian random number generator with a mean of 0 nA

and a standard deviation of 0.118 nA. Thus each of these 30 assays had a different draw of error from the random number generator.

The fitting function (equation 1 above) was fitted to each of the 30 resulting datasets using a Levenberg-Marquardt least-squares fit routine (MATLAB's `lsqnonlin` function).

The first guesses were set to $I_{max0} = 10$, $V_{ha0} = -100$, $Sa0 = 18$ and $Offset0 = 0.01$.

The results of this fitting yielded 30 values of each parameter, from which the mean and standard error (SD) were computed.

In all, we obtained 100 couples of such mean and SD values for each of the 4 parameters of the fitting function, corresponding to each of the 100 values of I_{max} generated. These results are shown in figure S3.

In A-G and B-H it clearly appears that the theoretical I_{max} is estimated without bias by the fitting, since the fitted versus theoretical I_{max} values lie along the diagonal in A and G, which is also seen as their ratio being centered around 1 in B and H. In the complete dataset, the error on the estimation of I_{max} is similar to that of the error on current measurement (H) whereas, in the incomplete dataset, the standard deviation is increased to about 2 nA. Thus the precision of the estimation of the I_{max} value by the fit is quite good, despite the fact that the incomplete dataset failed to represent more than about 66% of the full amplitude of the maximal current.

The estimation of V_{ha} in the complete dataset is entailed with an SD of 0.5 mV that is not dependent on the I_{max} value (I). When the dataset was incomplete (C) this error was increased, especially at low magnitudes of I_{max} . However, the penalty on the precision of the estimation of V_{ha} is not dramatic, as it remains within ± 2 mV around the mean. The comparison of histograms in D and G show that the estimate of V_{ha} becomes biased by +0.2 mV when the dataset is incomplete.

Similarly, comparisons of E with K and of F with L show that the precision of the estimation of the Sa parameter is degraded from an error around ± 0.5 mV to ± 2 mV when the dataset is incomplete, whereas a bias by -0.2 mV appears. Again, when the dataset is incomplete, it causes the error to increase but it still remains within 2 mV.

It is not surprising that a bias appears in the estimates of V_{ha} and Sa parameters since the propagation of a gaussian error on current measurements will not translate linearly through a highly non-linear function such as a Boltzmann function. The amplitude of these biases can be neglected since it is 10-fold smaller than the corresponding standard deviations.

From this analysis, we conclude that, despite failing to include the 34% upper range values of activated current, the decrease in precision of the estimation of V_{ha} and Sa parameters and the introduction of a small bias will not compromise analyzing changes in V_{ha} and Sa parameters derived by fitting a squared Boltzmann function to our datasets.

In short, the methods used to evaluate the characteristics of steady-state activation versus voltage were accurate enough for the study presented in our manuscript.

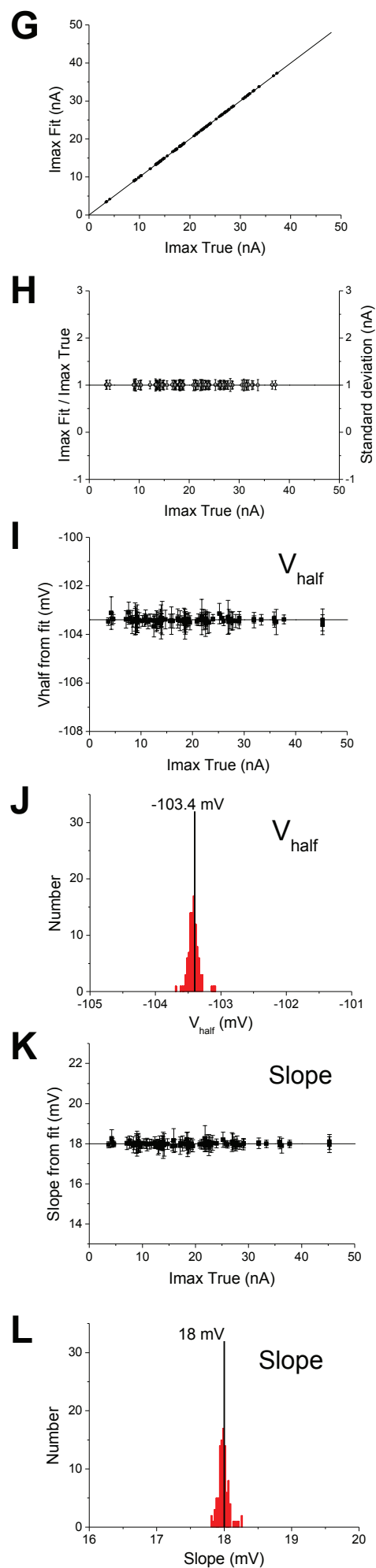
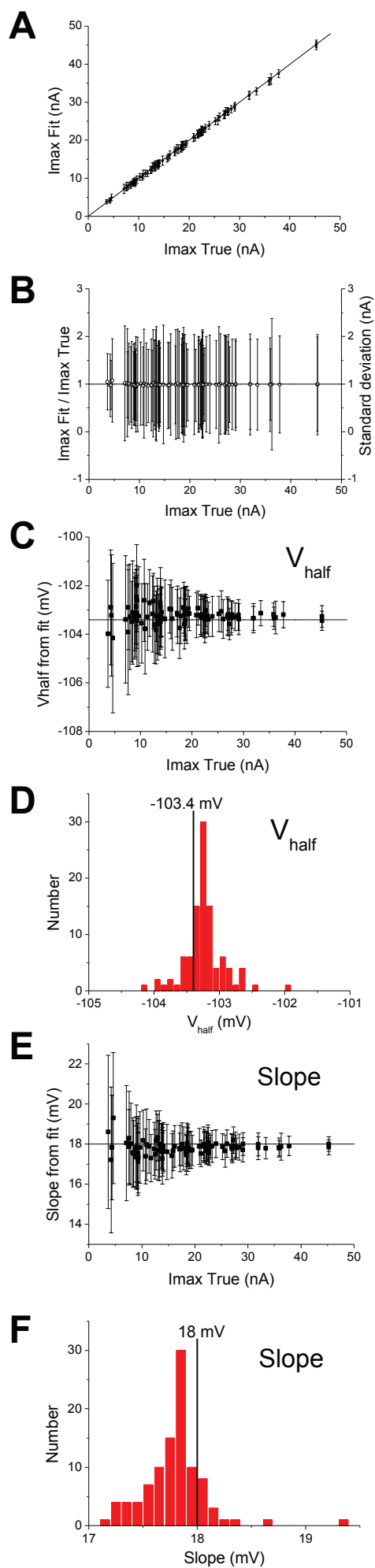


Figure S3. Comparison of the validity of fits between incomplete and complete datasets.

The left column shows the statistical properties of evaluation of parameters of the fitting function (equation 1) using incomplete datasets (generated for hyperpolarizing pulses values spanning -30 to -130 mV). The right column shows the properties from identical testing when the datasets were complete, i.e. generated for voltages ranging -30 to -200 mV, where the maximum of HCN4 current activation ought to be correctly represented.

A and G: Mean ***I_{max}*** values evaluated from fits with their SD bars were plotted versus the theoretical ***I_{max}*** values used to generate the datasets (***I_{max} True***).

B and H: The ratio of ***I_{max}*** obtained from the fit to the true value of ***I_{max}***. This ratio has no dimension. Superimposed to each data point is the error bar ($\pm$ SD, right vertical axis) in nA.

C and I: Evaluated mean ***V_{half}*** values (***V_{ha}*** in equation 1) with their SD bars plotted versus ***I_{max}*** current magnitudes.

D and J: Histogram of the mean ***V_{half}*** values with a vertical thick bar showing the theoretical value of ***V_{half}*** at -103.4 mV.

E and K: Evaluated mean ***Slope*** values (***S_a*** in equation 1) with their SD bars plotted versus ***I_{max}*** current magnitudes.

F and L: Histogram of the mean ***Slope*** values with a vertical bar showing the theoretical value of ***Slope*** at 18 mV.

4.5 La mutation V501M de la protéine HCN4 diminue l'expression et altère l'activation des canaux

4.5.1 Introduction

Une seconde mutation de HCN4 a été identifiée à l'état hétérozygote, après génotypage, chez un patient chinois atteint de bradycardie sinusale et de fibrillation atriale paroxystique. Elle correspond au remplacement d'une valine par une méthionine en position 501 (p.V501M). Cet acide aminé est localisé au niveau du domaine du pore de la protéine, sur le segment S6, une région très conservée entre les différentes isoformes (**Figure 13, Figure 33**) et entre les espèces. Le porteur de la mutation a aussi été génotypé pour *KCNQ1*, *KCNE1-5*, *KCNH2*, *SCN5A* et *KCNA5*, mais aucune autre mutation n'a été trouvée. De plus, ce variant n'a pas été retrouvé au sein de 200 sujets contrôles.

La mutation V501M a déjà été signalée dans une cohorte de patients cancéreux (COSMIC, Bamford et al., 2004), mais n'a pas été étudiée fonctionnellement.

Nous avons donc étudié l'effet de cette mutation sur la fonction du courant HCN4 après expression dans des cellules de mammifère.

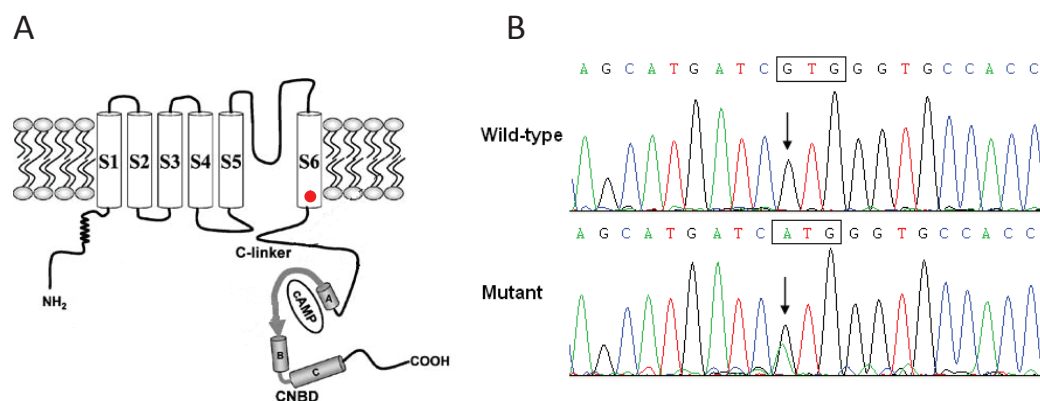


Figure 33: Identification et localisation de la mutation V501M de la protéine HCN4

A. Localisation de la mutation V501M au niveau du domaine S6 de la protéine. **B.**

Chromatogramme montrant la variation ponctuelle (c.1501G>A) dans la séquence nucléotidique (flèche).

4.5.2 Matériels et méthodes

Des cellules Cos-7 sont transfectées par des plasmides HCN4 WT ou porteurs de la mutation et contenant le gène EBO (voir protocole de l'étude du mutant D600E).

Une étude en patch-clamp est réalisée sur les cellules transfectées marquées par les billes anti-CD8, afin de déterminer les caractéristiques électrophysiologiques du mutant (voir protocole de l'étude du mutant D600E).

Le protocole d'immunomarquage et celui de western-blot sont décrits respectivement dans les parties 3.1.2.1 et 3.1.2.2.

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps de souris anti-hHCN4 (NeuroMab®, ref. APC-052) qui est dilué au 1/350 dans la solution de blocage.

L'anticorps secondaire utilisé pour la détection par fluorescence est un anticorps de poulet anti-lapin marqué par un Alexa 488, dilué au 1/1000 dans la solution de blocage.

4.5.3 Résultats

4.5.3.1 Propriétés électrophysiologiques

Des cellules Cos-7 transfectées ont été enregistrées en patch-clamp. Des protocoles conventionnels à deux créneaux ont été utilisés.

Bien que les cellules transfectées par le mutant seul (V501M) montrent des billes anti-CD8 attachées à leur surface, aucune n'exprime véritablement de courant I_f (**Figure 35**). En coexpression avec le WT, 45% des cellules qui ont été transfectées, comme en témoigne l'attachement des billes anti-CD8, exprimaient un courant I_f , alors que pour la condition WT, cette fraction était de 71%.

Concernant les amplitudes maximales de courant mesurées à la fin du premier créneau, on observe que la moyenne des valeurs mesurées pour la condition hétérozygote n'est pas significativement différente de celle pour le WT ($-11,69 \pm 5,6$ pA/pF ($n=8$) pour V501M+WT contre $-10,0 \pm 3,2$ pA/pF ($n=12$) pour le WT, mesurée à -130 mV) (**Figure 35**).

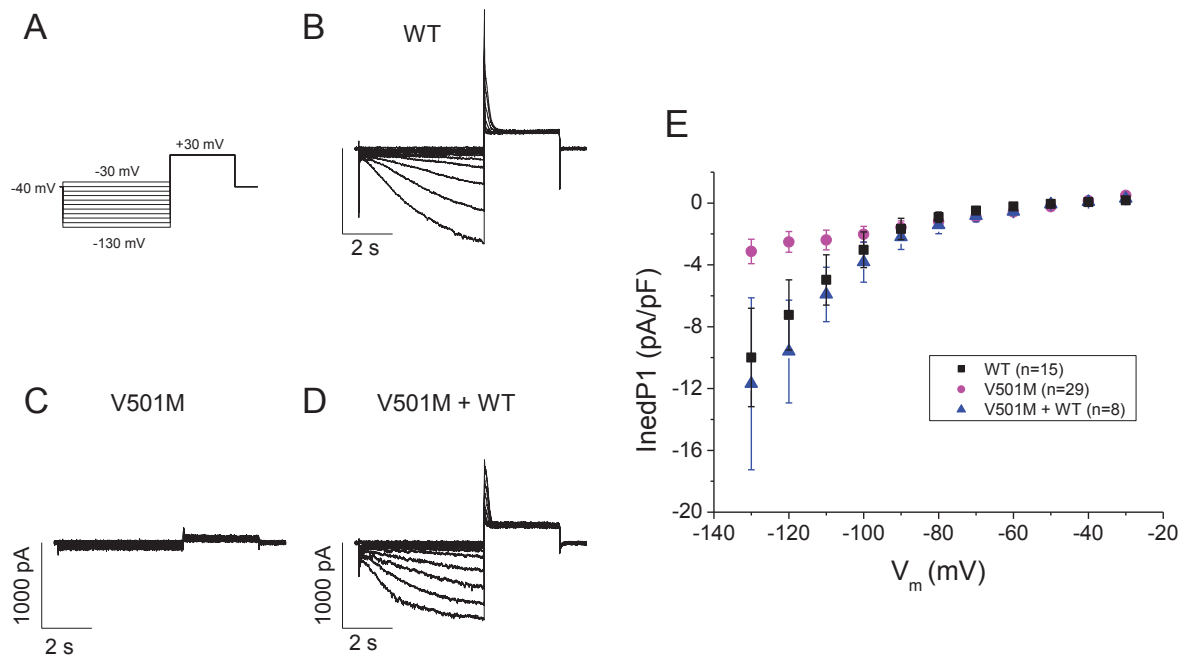


Figure 35 : Effet de la mutation V501M sur les courbes courant/voltage du courant HCN4.

Enregistrements représentatifs du courant HCN4 en configuration cellule entière après application du protocole de voltage illustré en (A). Depuis un voltage de maintien à -40 mV, un créneau hyperpolarisant de 5 s à des voltages allant de -30 mV à -130 mV est suivi d'un créneau de 3 s à +30 mV. B, C et D montrent des exemples représentatifs d'enregistrement des courants de cellules exprimant respectivement le WT (B), le mutant V501M seul (C) et le mélange des deux (D). E. Courants moyens enregistrés dans les trois conditions à la fin du premier créneau de voltage.

Concernant les cinétiques d'activation, la mutation V501M en coexpression avec le WT induit un décalage négatif de la courbe d'activation à l'état stable de - 9 mV ($V_{1/2a} = -104,9 \pm 3,4$ mV pour V501M+WT vs $96,1 \pm 1,9$ mV pour le WT), tout en gardant une valeur de pente identique (Figure 36). Les constantes de temps d'activation et de désactivation ne sont pas modifiées par la mutation par rapport au WT, de même pour le potentiel d'inversion qui est d'environ -40 mV (Figure 36).

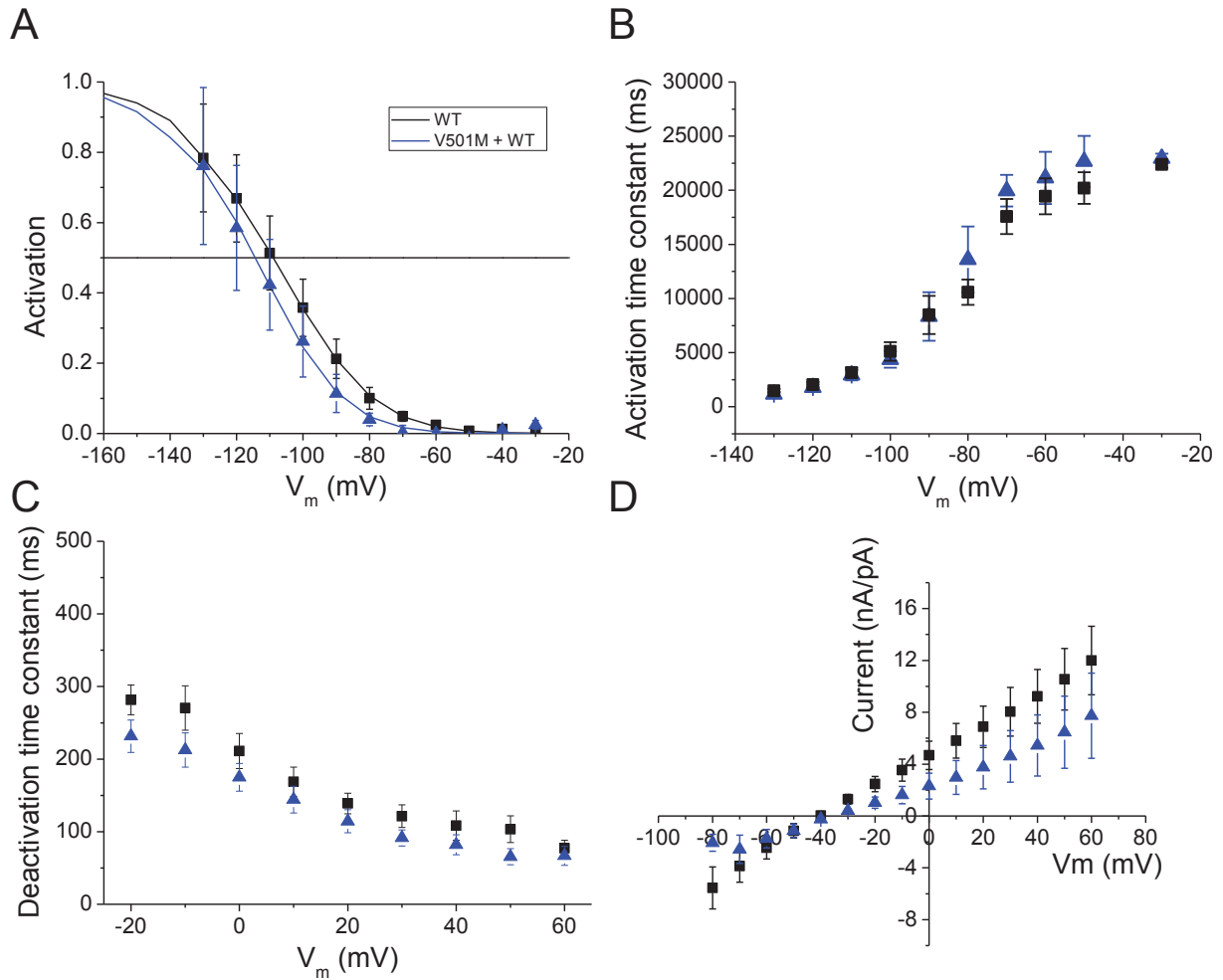


Figure 36 : Caractéristiques biophysiques du mutant V501M exprimé dans les cellules Cos- 7.

A. La courbe d'activation à l'état stable dans la série V501M+WT (symboles bleus) est déplacée de 9 mV en direction hyperpolarisante par rapport au WT (symboles noirs). **B.** La constante de temps d'activation est comparable dans les deux séries à tous les voltages. **C.** La constante de temps de désactivation est réduite de manière non significative dans la condition hétérozygote par rapport au WT. **D.** Mesure du voltage d'inversion du courant HCN4 du WT (n=13) et de V501M+WT (n=6). Après un créneau à -120 mV, l'amplitude du courant de queue est mesurée au début d'un second créneau à un voltage variable. La courbe du courant instantané en fonction du voltage montre l'absence de rectification du courant et un potentiel d'inversion inchangé.

4.5.3.2 Etude de la réponse à l'ivabradine

Une étude récente a identifié le site moléculaire de liaison de l'ivabradine sur HCN4 et mis en évidence que les acides aminés Y506, F509 et I510 y jouent un rôle essentiel (Bucchi et al., 2013). Etant donné la proximité de la localisation de la

mutation V501M, nous avons voulu tester l'effet de cette mutation sur le blocage du courant I_f par l'ivabradine.

Un protocole classique de voltage à double créneau a été utilisé. A partir d'un potentiel de maintien à -40 mV, un premier créneau de voltage hyperpolarisant de 5 secondes à -110 mV a été appliqué afin d'activer les canaux HCN4. Les cellules ont ensuite été dépolarisées pendant 3 secondes à +30 mV afin d'enregistrer un courant de queue avant de retourner au potentiel de maintien. Le protocole a été appliqué toutes les 8 secondes (**Figure 37**).

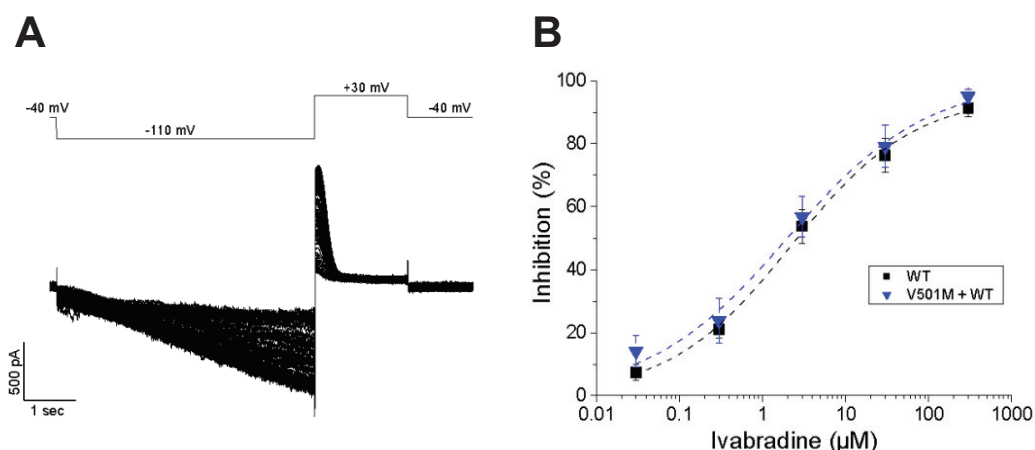


Figure 37 : Réponse à l'ivabradine du courant HCN4 exprimé dans des cellules Cos-7.

A. Illustration du protocole de voltage utilisé ainsi qu'un exemple représentatif des traces de courant obtenues au long de l'expérimentation. **B.** Courbe dose-réponse de l'inhibition du courant HCN4 en fonction de la concentration en ivabradine (WT : n=10, V501M+WT n=5).

Un système de perfusion par gravité permet d'appliquer localement différentes concentrations croissantes d'ivabradine sur les cellules exprimant le plasmide HCN4 WT ou bien coexprimant les plasmides WT et V501M.

Après avoir atteint un état stable pour chaque dose d'ivabradine, les courants de queue sont mesurés et on calcule le pourcentage d'inhibition du courant par rapport au courant maximal initial. Les données sont portées en fonction de la concentration d'ivabradine afin de construire la courbe dose-réponse (**Figure 37**). Les données ont ensuite été ajustées par l'équation de Hill : $y = V_{max} \cdot [I]^n / (k^n + [I]^n)$ avec V_{max} la valeur d'inhibition maximale, $[I]$ la concentration d'ivabradine, k la valeur de l'IC50 et n le nombre de Hill.

Ainsi, on observe que la mutation V501M ne modifie pas de manière significative la sensibilité du courant I_f à l'ivabradine (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Valeurs des paramètres après ajustement par l'équation de Hill des données de la courbe dose-réponse à l'ivabradine.

	y_{max} (pA/pF)	IC₅₀ (μM)	n
WT	95,4 ± 3,7	2,2 ± 0,5	0,59 ± 0,06
V501M + WT	100,1 ± 7,5	2,0 ± 0,9	0,52 ± 0,09

4.5.3.3 Modélisation de l'effet de la mutation V501M

Le modèle de cellule du nœud sinusal de lapin de Severi et al. (Severi et al., 2012) a été utilisé afin de caractériser l'effet de la mutation V501M sur le déroulement du courant I_f et les caractéristiques du courant de pacemaker.

Lorsque l'on insère dans le modèle un décalage de la valeur de voltage de demi-activation ($V_{1/2a}$) de -9 mV, on observe une diminution importante du courant I_f ainsi que de la pente de dépolarisation. Les potentiels d'action sont alors espacés de 412 ms (vs 332 ms dans le WT) (**Figure 38**).

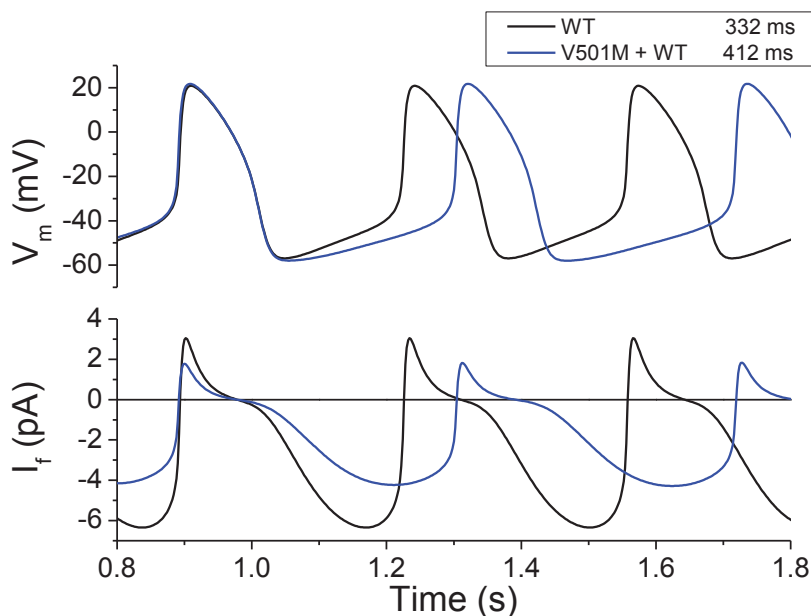


Figure 38 : Effets de la mutation V501M dans un modèle de cellule du NSA.

Modélisation des conséquences de l'effet majeur de la mutation V501M (décalage de l'activation) sur le potentiel d'action sinusal et sur le courant I_f . La mutation entraîne une bradycardie.

4.5.3.4 Quantification et localisation des protéines HCN4

Les cellules transfectées par le mutant seul ne montrent pas de courant en patch-clamp. Ceci peut être dû à une absence de la synthèse de la protéine mutée ou bien d'un défaut d'adressage de la protéine à la membrane.

L'analyse en western-blot des protéines HCN4 totale sur des cellules Cos-7 transfectées, montre une réduction de la quantité de protéine mutée vis-à-vis de celle des protéines WT (**Figure 39**). Le niveau de tubuline, qui sert à quantifier les protéines totales, est similaire pour chaque condition.

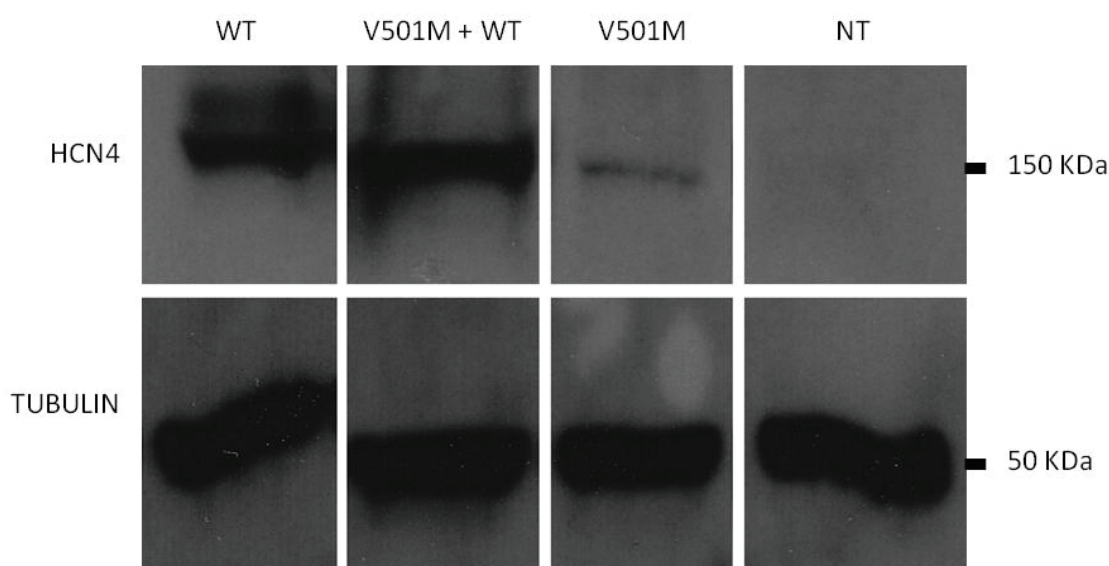


Figure 39 : Western blot des protéines totales.

En haut, marquage des protéines HCN4 WT, V501M+WT et V501M par un anticorps anti-HCN4 et en bas, par un anticorps anti-tubuline.

La localisation des protéines a été analysée par une étude d'immunomarquage (**Figure 40**). Concernant les protéines WT, il apparaît que les canaux synthétisés sont bien exportés à la membrane des cellules Cos-7 qui présentent un marquage plutôt uniforme. Concernant les cellules exprimant la protéine mutée, très peu d'entre-elles montrent un marquage HCN4. Celui-ci est alors concentré au niveau d'une zone dans le cytoplasme, proche du noyau, qui s'apparenterait à l'appareil de Golgi et on ne note pas de marquage membranaire. Dans la condition hétérozygote,

on a une situation intermédiaire où on observe un marquage HCN4 de l'ensemble de la cellule mais présentant en même temps des figures de rétention dans l'appareil de Golgi.

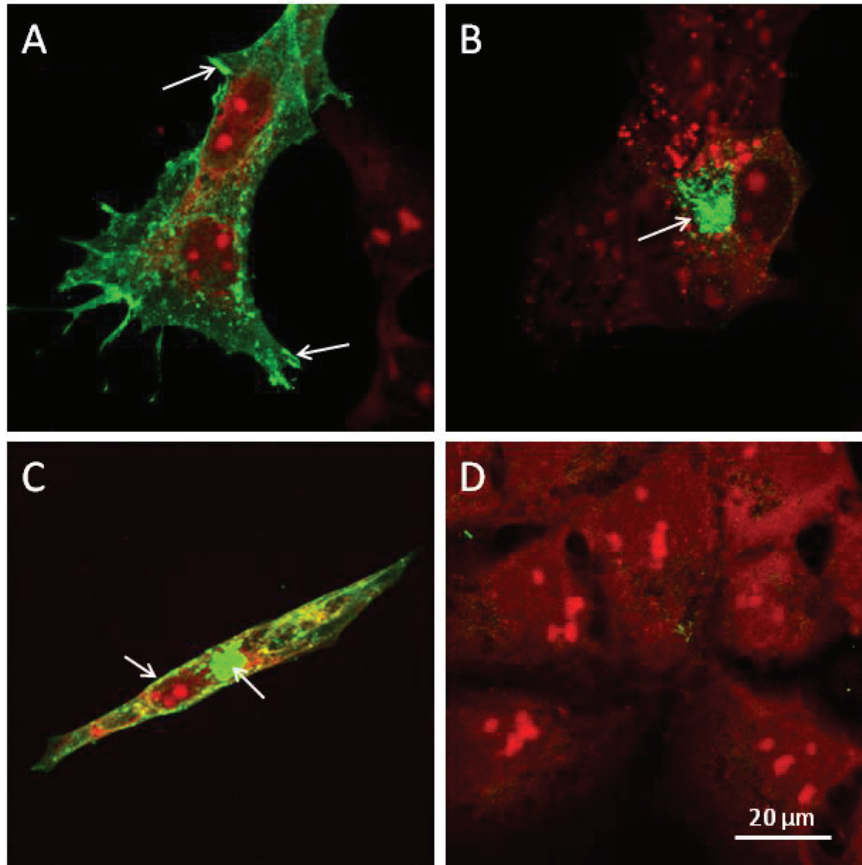


Figure 40 : Observations des cellules Cos-7 exprimant les canaux HCN4 WT et mutés au microscope confocal. Les cellules ont d'abord été exposées à un anticorps primaire de souris anti-HCN4 puis à un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un fluorophore Alexa 488 (vert). Un marquage au bromure d'éthidium permet de localiser les acides nucléiques (rouge). Exemples représentatifs des cellules transfectées avec la protéine HCN4 WT (**A**), V501M (**B**), V501M+WT (**C**) et des cellules non transfectées (**D**).

4.5.4 Discussion

Lorsque les cellules Cos-7 sont transfectées avec le plasmide V501M/CD8 seul, une faible proportion de cellules montrent un marquage par l'anticorps anti-HCN4 ce qui est en accord avec la faible densité de la bande à 155 KDa observée en western blot (**Figure 39**). De plus, lorsqu'elles sont synthétisées, les protéines

sont retenues et ne sont pas exportées à la membrane (**Figure 40B**). Ceci peut expliquer que nous n'ayons pas observé de courant mesurable dans des cellules pourtant porteuses de marqueur CD8 (**Figure 35**).

En cotransfection avec le WT, seules 45% des cellules transfectées expriment un courant contre 71% des cellules transfectées avec le WT seul. Cependant, la densité de courant est comparable à celle du WT (**Figure 35**). Il semblerait donc que la présence des sous-unités WT puissent corriger partiellement le défaut d'adressage des tétramères formés avec une ou des sous-unités mutées. Ceci est confirmé par la présence de HCN4 à la membrane (**Figure 40C**). Un tel effet global chez un porteur hétérozygote pourrait réduire le courant I_f d'un tiers.

Par ailleurs, la présence du mutant en cotransfection avec le WT, cause un glissement négatif de la courbe d'activation d'une manière dominante. Cette seule modification provoque une baisse de la fréquence spontanée de 20% dans un modèle de cellule de NSA humain (**Figure 38**).

Cette mutation de la région du pore cause des effets comparables à ceux rapportés pour d'autres mutations dans cette même région : G480R (Nof et al., 2007), Y481H (Milano et al., 2014), G482R (Milano et al., 2014; Schweizer et al., 2014) et A485V (Laish-Farkash et al., 2010).

Ces résultats justifient de considérer cette mutation comme cause probable de la bradycardie et d'une prédisposition à la FA, chez le patient porteur.

5 Discussion générale et perspectives

Différents mécanismes pour un même phénotype

Le fonctionnement correct du cœur nécessite une contraction efficace et uniforme des cellules cardiaques, faisant suite à l'arrivée du potentiel d'action.

Certaines mutations qui causent la modification de protéines de canaux ioniques impliquées dans l'élaboration du potentiel d'action, peuvent altérer la durée et/ou la forme de celui-ci. Ceci peut avoir des conséquences graves qui peuvent mettre en danger les patients porteurs de ces mutations.

Ce travail de thèse porte sur l'étude biophysique de plusieurs mutations identifiées chez des patients atteints de troubles du rythme cardiaque. Ainsi, il présente l'étude de trois mutations identifiées chez des patients atteints du syndrome du QT long, et de deux autres chez des patients atteints de bradycardie sinusale et de fibrillation atriale.

Dans un premier temps, ce travail illustre bien le fait que des mutations différentes sur un même gène, ou bien affectant des gènes différents et ayant des caractéristiques biophysiques différentes, peuvent engendrer un même phénotype. Par exemple, le syndrome du QT long causé par la mutation R148W du gène KCNH2 résulte d'une diminution du courant I_{Kr} faisant suite à un dysfonctionnement de certains tétramères, alors que celui dû à la mutation F627L du même gène, résulte d'un défaut d'adressage des protéines à la membrane et d'une perte partielle des caractéristiques biophysiques des canaux. Quant à la mutation Q1476R du gène SCN5A, le syndrome du QT long observé chez les porteurs est dû à une augmentation du courant sodique persistant.

Ceci révèle l'importance de l'étude des conséquences biophysiques des mutations des canaux ioniques. En effet, afin de convenir d'un traitement le plus efficace possible pour un patient porteur d'une mutation délétère, il est nécessaire d'identifier le mécanisme pathogène de la mutation pour ainsi pouvoir éventuellement le contrer. Ainsi, on pourrait penser administrer chez des patients porteurs d'une mutation qui entraînerait un défaut d'adressage des protéines à la membrane cellulaire, une molécule capable de rétablir l'adressage des canaux mutés, ou encore administrer chez un patient avec une mutation augmentant le courant sodique persistant, une molécule qui bloquerait spécifiquement ce courant.

La connaissance fondamentale des effets des mutations des canaux ioniques constituerait une avancée vers la médecine personnalisée.

Lorsqu'on s'intéresse par exemple aux mutations du gène KCNH2, on dénombre aujourd'hui plus de 800 mutations (données personnelles) identifiées chez des patients atteints de SQTl, de SQTc, de torsades de pointes et chez des patients ressuscités ou décédés d'une mort subite. Or, actuellement, moins d'une centaine de ces mutations ont été étudiées de manière approfondie. Pour les autres, on ne sait pas si la mutation est responsable de la pathologie observée chez les porteurs ou bien si elle est sans conséquence. Certes, il existe aujourd'hui des outils performants de prédiction permettant d'émettre un avis sur le caractère pathogène d'une mutation. Le logiciel Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010) analyse les effets potentiellement délétères des variants faux-sens en se basant sur les homologies et les alignements de séquences mais aussi en analysant le remaniement de la protéine (encombrement stérique, interactions hydrophobes...) suite au changement de l'acide aminé à une position donnée. Cependant, l'utilisation de tels outils n'est pas suffisante pour déceler le caractère pathogène d'une mutation, et seule l'exploration fonctionnelle le permet. Par exemple, la mutation G601S de KCNH2, rapportée plusieurs fois chez des patients SQTl (Akimoto et al., 1998; Kapplinger et al., 2009; Splawski et al., 2000), est décrite comme bénigne par le logiciel Polyphen2 (score à 0,125) alors que l'étude fonctionnelle révèle une diminution importante du courant I_{Kr} chez le mutant due à un défaut de maturation de la protéine et une perte de son exportation à la membrane (Anderson et al., 2006; Furutani et al., 1999).

De plus, je souhaiterais souligner ici l'importance d'étudier les effets des mutations de canaux ioniques dans la condition hétérozygote, condition la plupart du temps retrouvée chez les porteurs. On rencontre encore plusieurs études où seule la condition homozygote mutée est comparée à la condition WT (Chen et al., 1999; Partemi et al., 2013; Shao et al., 2011...). Plusieurs travaux ont montré que l'on ne peut pas « moyenner » ces deux résultats pour extrapoler à la condition hétérozygote. En effet, certaines mutations qui présentent un défaut majeur quand elles sont exprimées seules, peuvent être silencieuses lorsqu'elles sont exprimées en condition hétérozygote. Le WT domine alors l'effet de la mutation (Keller et al., 2009, étude de la mutation F627L du gène hERG). Il existe aussi l'effet contraire où la dominance est détenue par le mutant, et l'effet de la mutation est maintenu chez l'hétérozygote (diminution de l'amplitude du courant I_{Kr} chez le mutant et chez

l'hétérozygote ; Saenen et al., 2007, rétention des canaux SCN5A par le mutant: Clatot et al., 2012). Enfin, il peut aussi exister des cas où la mutation n'entraîne aucune altération visible lorsqu'elle est exprimée seule mais qui se révèle lorsqu'elle est exprimée avec le WT (étude de la mutation R148W du gène hERG).

Canaux ioniques et tétramérisation

Les canaux ioniques sont la plupart du temps constitués d'un assemblage de 4 sous-unités en tétramère. C'est le cas des canaux hERG et HCN4 présentés dans cette étude. Lorsqu'il n'y a qu'une seule sous-unité présente, le problème reste simple, puisque tous les canaux synthétisés sont des homotétramères identiques les uns aux autres d'un point de vue conformationnel et vraisemblablement aussi fonctionnel. En revanche, lorsque les canaux ioniques sont constitués d'un assemblage de sous-unités différentes, ce qui peut se produire soit naturellement, (c'est par exemple le cas des canaux HCNs du nœud sinusal qui sont formés de sous-unités HCN4 et HCN1), soit lorsqu'il y a présence d'une mutation à l'état hétérozygote, le problème se complique. En effet, si l'on émet l'hypothèse qu'il n'y a aucune contrainte de sélection des sous-unités les unes vis-à-vis des autres, la totalité des 16 combinaisons séquentielles au hasard en tétramères de 2 sous-unités différentes devraient être également probables (**Figure 41**).

Dans le cas d'une mutation hétérozygote, on observe que seulement 1/16 des canaux exprimés à la membrane sont des homotétramères WT et 1/16 des homotétramères mutés. Tous les autres canaux sont un mélange d'hétérotétramères qui peuvent avoir des caractéristiques différentes.

Notre étude sur la mutation R148W du gène hERG, a révélé que cette mutation exprimée seule dans des ovocytes de Xénope produisait un courant identique en amplitude et en cinétique à celui observé pour le WT. Cependant, lorsqu'on a coexprimé la mutation avec le WT, l'amplitude du courant maximal mesuré a été diminuée d'environ 29% bien qu'aucune modification significative des cinétiques n'ait été observée.

La diminution d'amplitude qui est observée seulement en coexpression avec le WT peut être expliquée par une diminution du nombre de canaux fonctionnels présents à la surface. Persistant dans notre hypothèse que tous les canaux peuvent se former, on peut expliquer la diminution du courant par le fait que certains canaux

composés d'hétérotétramères de sous-unités WT et de sous-unités R148W n'atteignent pas la membrane cellulaire ou ne sont pas fonctionnels.

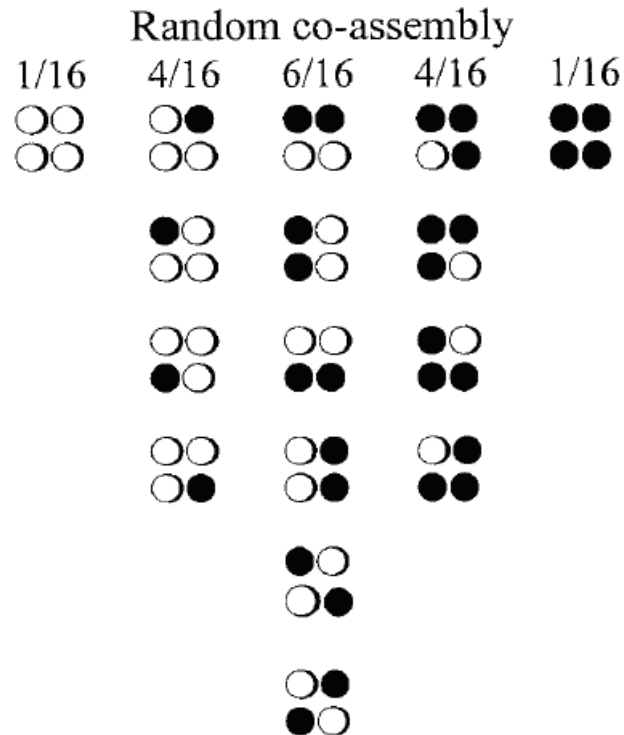


Figure 41 : Assemblage des sous-unités en présence d'une mutation hétérozygote.

Illustration des différentes possibilités d'assemblage au hasard en tétramères de deux sous-unités alpha différentes (cercles vides: WT; cercles pleins: mutées). Les tétramères sont classés par colonne en fonction du nombre décroissant de sous-unités WT. Un seizième des tétramères contiennent quatre sous-unités WT et quinze seizièmes contiennent au moins une sous-unité mutée. Un effet dominant négatif est produit lorsqu'il suffit qu'au moins une unité mutée soit présente pour qu'elle confère au courant le phénotype muté. Copié de January et al., 2000.

Trois formes tétramériques représentent chacune une fraction de $4/16^e$, soit 25% des canaux formés, ce sont les formes WWWM, WWMM et WMMM. Si l'une de ces formes manque à contribuer à la conductance totale de la cellule, la perte de courant rendrait approximativement compte de la perte de courant de 29% observée dans le cas d'expression hétérozygote de la mutation R148W. Cependant, des effets de diminution partielle de la contribution au courant de certains hétérotétramères pourraient aussi rendre compte de l'effet observé.

Discussion des effets sur les concentrations ioniques intracellulaires

Certaines mutations, qui entraînent un dysfonctionnement des canaux, peuvent perturber l'homéostasie ionique des cellules. Les effets sur les concentrations ioniques intracellulaires, dont nous avons vu qu'ils pouvaient influencer sur les conséquences physiopathologiques d'une mutation, pourraient être analysés pour d'autres mutations touchant d'autres canaux. En effet, le courant hERG, transporte une fraction d'ions Na^+ et dans le cas de la mutation F627L, cette fraction est grandement augmentée, comme en témoigne le glissement du potentiel d'inversion vers des potentiels plus positifs.

Concernant le canal HCN4, qui transporte une fraction d'ions Ca^{2+} (Yu et al., 2004, 2007), la part prise par ce phénomène dans la modulation de l'activité pacemaker de cellules du nœud sinusal pourrait être évaluée. Il pourrait être également examiné si certaines des mutations sur HCN4 causent un changement de sélectivité ionique.

Ceci pourrait être approché respectivement par mesures ioniques intracellulaires par le "Sodium Green" ou le Fura2, et par l'utilisation de modèles mathématiques appropriés de cellules cardiaques.

6 Conclusions

Nous concluons que des effets pathogènes semblables peuvent être produits par des mécanismes très différents d'altération des propriétés des canaux ioniques. De plus, nous avons aussi vu que des altérations situées dans une zone de la protéine jugée peu importante fonctionnellement (C linker pour D600E/HCN4) peuvent altérer significativement le fonctionnement d'une zone voisine (site de fixation de l'AMPc).

Une revue exhaustive des mutations du gène hERG (données personnelles) nous permet de compter environ 1000 variants, dont seulement 200 ont été étudiés à ce jour. Concernant la trentaine de variants rapportés du gène HCN4, seulement 16 ont été étudiés fonctionnellement.

Parmi toutes les mutations détectées sur ces deux gènes, une large majorité reste donc à caractériser. Or il ne semble pas suffisant de se fier à une évaluation à priori de la gravité d'une mutation. Des méthodes d'étude en grand nombre (Patch-clamp automatique) sont disponibles pour le criblage des molécules afin de repérer des effets arythmogènes. Ces méthodes devraient permettre d'aborder une étude systématique des mutations restant à caractériser. Les études rapportées ici montrent que la mise en place et le pilotage d'une telle approche nécessite une expertise approfondie de l'étude électrophysiologique des mutations de canaux ioniques.

Par ailleurs, l'évaluation quantitative des conséquences fonctionnelles des modifications biophysiques des canaux peut être pratiquée dans le contexte intégratif de modèles mathématiques de cellules cardiaques humaines, qui sont progressivement affinés, et permettent notamment d'évaluer des modifications de l'homéostasie ionique. Ceci peut aussi être documenté dans les modèles émergents de cellules cardiaques différenciées à partir de cellules des patients porteurs de ces mutations, une approche en cours de développement dans l'unité de Neurocardiologie.

7 Références bibliographiques

Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T., and Goldstein, S.A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97, 175–187.

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.

Aggarwal, S.K., and MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16, 1169–1177.

Akimoto, K., Furutani, M., Imamura, S., Furutani, Y., Kasanuki, H., Takao, A., Momma, K., and Matsuoka, R. (1998). Novel missense mutation (G601S) of HERG in a Japanese long QT syndrome family. *Hum.Mutat. Suppl* 1, S184–S186.

Algra, A., Tijssen, J.G., Roelandt, J.R., Pool, J., and Lubsen, J. (1993). QT interval variables from 24 hour electrocardiography and the two year risk of sudden death. *Br. Heart J.* 70, 43–48.

Amoros, I., Jimenez-Jaimez, J., Tercedor, L., Barana, A., Gomez, R., la Fuente, M.G. de, Dolz-Gaiton, P., Alvarez, M., Martinez-Espin, E., Lorente, J.A., et al. (2011). Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 8, 463–470.

Anderson, C.L., Delisle, B.P., Anson, B.D., Kilby, J.A., Will, M.L., Tester, D.J., Gong, Q., Zhou, Z., Ackerman, M.J., and January, C.T. (2006). Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation* 113, 365–373.

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

Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P.A., Stratton, M.R., et al. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* 91, 355–358.

Baruscotti, M., Bucchi, A., and DiFrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol. Ther.* *107*, 59–79.

Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* *15*, 951–960.

Behr, E.R., Savio-Galimberti, E., Barc, J., Holst, A.G., Petropoulou, E., Prins, B.P., Jabbari, J., Torchio, M., Berthet, M., Mizusawa, Y., et al. (2015). Role of common and rare variants in SCN10A: results from the Brugada syndrome QRS locus gene discovery collaborative study. *Cardiovasc. Res.* *106*, 520–529.

Belloq, C., van Ginneken, A.C.G., Bezzina, C.R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M.M.A.M., Baró, I., and Wilde, A.A.M. (2004). Mutation in the KCNQ1 Gene Leading to the Short QT-Interval Syndrome. *Circulation* *109*, 2394–2397.

Benjamin, E.J., Rice, K.M., Arking, D.E., Pfeufer, A., van Noord, C., Smith, A.V., Schnabel, R.B., Bis, J.C., Boerwinkle, E., Sinner, M.F., et al. (2009). Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat. Genet.* *41*, 879–881.

Bezanilla, F., and Armstrong, C.M. (1972). Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.* *60*, 588–608.

Bian, J.S., Cui, J., Melman, Y., and McDonald, T.V. (2004). S641 contributes HERG k⁺ channel inactivation. *Cell.Biochem.Biophys.* *41*, 25–40.

Body, S.C., Collard, C.D., Shernan, S.K., Fox, A.A., Liu, K.-Y., Ritchie, M.D., Perry, T.E., Muehlschlegel, J.D., Aranki, S., Donahue, B.S., et al. (2009). Variation in the 4q25 chromosomal locus predicts atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *2*, 499–506.

Bois, P., Bescond, J., Renaudon, B., and Lenfant, J. (1996). Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 1051–1057.

Brand, F.N., Abbott, R.D., Kannel, W.B., and Wolf, P.A. (1985). Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30-year follow-up in the Framingham Study. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *254*, 3449–3453.

Brown, H., DiFrancesco, D., and Noble, S. (1979). Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.* *81*, 175–204.

Brugada, R., Hong, K., Dumaine, R., Cordeiro, J., Gaita, F., Borggrefe, M., Menendez, T.M., Brugada, J., Pollevick, G.D., Wolpert, C., et al. (2004). Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 109, 30–35.

Bucchi, A., Baruscotti, M., and DiFrancesco, D. (2002). Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol.* 120, 1–13.

Bucchi, A., Baruscotti, M., Nardini, M., Barbuti, A., Micheloni, S., Bolognesi, M., and DiFrancesco, D. (2013). Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 Channels. *PLoS.One.* 8, e53132.

Carmeliet, E. (1992). Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 809–817.

Catterall, W.A. (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 317–338.

Chahine, M., Chen, L.Q., Barchi, R.L., Kallen, R.G., and Horn, R. (1992). Lidocaine block of human heart sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 1231–1236.

Chandler, N.J., Greener, I.D., Tellez, J.O., Inada, S., Musa, H., Molenaar, P., DiFrancesco, D., Baruscotti, M., Longhi, R., Anderson, R.H., et al. (2009). Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119, 1562–1575.

Chang, I.K., Shyu, M.K., Lee, C.N., Kau, M.L., Ko, Y.H., Chow, S.N., and Hsieh, F.J. (2002). Prenatal diagnosis and treatment of fetal long QT syndrome: a case report. *Prenat.Diagn.* 22, 1209–1212.

Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M.T., and Sanguinetti, M.C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* 274, 10113–10118.

Chen, J., Mitcheson, J.S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., and Sanguinetti, M.C. (2001). The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11277–11282.

Chen, L., Marquardt, M.L., Tester, D.J., Sampson, K.J., Ackerman, M.J., and Kass, R.S. (2007). Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20990–20995.

Chen, Q., Kirsch, G.E., Zhang, D., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., Potenza, D., Moya, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., et al. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293–296.

Chevalier, P., Bellocq, C., Millat, G., Piqueras, E., Potet, F., Schott, J.J., Baro, I., Lemarec, H., Barhanin, J., Rousson, R., et al. (2007). Torsades de pointes complicating atrioventricular block: evidence for a genetic predisposition. *Heart Rhythm* 4, 170–174.

Christe, G., Theriault, O., Chahine, M., Millat, G., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Deschenes, I., Ficker, E., and Chevalier, P. (2008). A new C-terminal HERG mutation A915fs+47X associated with symptomatic LQT2 and auditory-trigger syncope. *Heart Rhythm* 5(11), 1577–1586.

Clatot, J., Ziyadeh-Isleem, A., Maugenre, S., Denjoy, I., Liu, H., Dilanian, G., Hatem, S.N., Deschênes, I., Coulombe, A., Guicheney, P., et al. (2012). Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5 α -subunits. *Cardiovasc. Res.* 96, 53–63.

Colenso, C.K., Sessions, R.B., Zhang, Y.H., Hancox, J.C., and Dempsey, C.E. (2013). Interactions between voltage sensor and pore domains in a hERG K⁺ channel model from molecular simulations and the effects of a voltage sensor mutation. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1358–1370.

Compton, S.J., Lux, R.L., Ramsey, M.R., Strelich, K.R., Sanguinetti, M.C., Green, L.S., Keating, M.T., and Mason, J.W. (1996). Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation* 94, 1018–1022.

Crotti, L., Johnson, C.N., Graf, E., De Ferrari, G.M., Cuneo, B.F., Ovadia, M., Papagiannis, J., Feldkamp, M.D., Rathi, S.G., Kunic, J.D., et al. (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation* 127, 1009–1017.

Cui, J., Melman, Y., Palma, E., Fishman, G.I., and McDonald, T.V. (2000). Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr. Biol.* 10, 671–674.

Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D., and Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795–803.

Cushny, A., and Edmunds, C. (1906). Paroxysmal irregularity of the heart and auricular fibrillation. *Bulloch W Ed Stud. Pathol. Aberd. Scotl. Univ. Aberd.* 95–110.

Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit RevBiochem* 22, 317–387.

Delisle, B.P., Anson, B.D., Rajamani, S., and January, C.T. (2004). Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ. Res.* 94, 1418–1428.

Denyer, J.C., and Brown, H.F. (1990). Pacemaking in rabbit isolated sino-atrial node cells during Cs⁺ block of the hyperpolarization-activated current if. *J. Physiol.* 429, 401–409.

DiFrancesco, D. (1981). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* 314, 377–393.

DiFrancesco, D., and Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145–147.

DiFrancesco, D., and Tromba, C. (1988). Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* 405, 493–510.

DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M., and Tromba, C. (1986). Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol* 377, 61–88.

Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.

Duhme, N., Schweizer, P.A., Thomas, D., Becker, R., Schroter, J., Barends, T.R., Schlichting, I., Draguhn, A., Bruehl, C., Katus, H.A., et al. (2012). Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *Eur. Heart J.*

Ellinor, P.T., Lunetta, K.L., Glazer, N.L., Pfeufer, A., Alonso, A., Chung, M.K., Sinner, M.F., de Bakker, P.I.W., Mueller, M., Lubitz, S.A., et al. (2010). Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat. Genet.* 42, 240–244.

Ellinor, P.T., Lunetta, K.L., Albert, C.M., Glazer, N.L., Ritchie, M.D., Smith, A.V., Arking, D.E., Müller-Nurasyid, M., Krijthe, B.P., Lubitz, S.A., et al. (2012). Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat. Genet.* 44, 670–675.

Es-Salah-Lamoureux, Z., Xiong, P.Y., Goodchild, S.J., Ahern, C.A., and Fedida, D. (2011). Blockade of permeation by potassium but normal gating of the G628S nonconducting hERG channel mutant. *Biophys. J.* 101, 662–670.

Evans, A., Bagnall, R.D., Duflou, J., and Semsarian, C. (2013). Postmortem review and genetic analysis in sudden infant death syndrome: an 11-year review. *Hum. Pathol.* 44, 1730–1736.

Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1–C14.

Ficker, E., Jarolimek, W., Kiehn, J., Baumann, A., and Brown, A.M. (1998). Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels. *Circ. Res.* 82, 386–395.

Fox, K., Ford, I., Steg, P.G., Tendera, M., Ferrari, R., and BEAUTIFUL Investigators (2008a). Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372, 807–816.

Fox, K., Ford, I., Steg, P.G., Tendera, M., Robertson, M., Ferrari, R., and BEAUTIFUL investigators (2008b). Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 372, 817–821.

Fressart, V., Ormand, C., and Magnin Poull, I. (2010). A Propos de deux variants R148W et R176W de KCNH2 □: mutations responsables de syndrome du QT long ou polymorphismes rares.

Furutani, M., Trudeau, M.C., Hagiwara, N., Seki, A., Gong, Q., Zhou, Z., Imamura, S., Nagashima, H., Kasanuki, H., Takao, A., et al. (1999). Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation* 99, 2290–2294.

Gang, H., and Zhang, S. (2006). Na⁺ permeation and block of hERG potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 128, 55–71.

Gellens, M.E., George, A.L., Chen, L., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R.L., and Kallen, R.G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 554–558.

George, A.L., Varkony, T.A., Drabkin, H.A., Han, J., Knops, J.F., Finley, W.H., Brown, G.B., Ward, D.C., and Haas, M. (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet. Cell Genet.* 68, 67–70.

Gianulis, E.C., and Trudeau, M.C. (2011). Rescue of aberrant gating by a genetically encoded PAS (Per-Arnt-Sim) domain in several long QT syndrome mutant human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J. Biol. Chem.* 286, 22160–22169.

Giorgetti, A., Carloni, P., Mistrik, P., and Torre, V. (2005). A homology model of the pore region of HCN channels. *Biophys. J.* 89, 932–944.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.

Go, A.S., Hylek, E.M., Phillips, K.A., Chang, Y., Henault, L.E., Selby, J.V., and Singer, D.E. (2001). Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 285, 2370–2375.

Goldin, A.L. (2006). Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. In *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels*, J.J. Clare, and D.J. Trezise, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1–25.

Goldin, A.L., Snutch, T., Lübbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L.C., Lester, H.A., and Dunn, R. (1986). Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7503–7507.

Goldman, D.E. (1943). Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27, 37–60.

Gomez-Varela, D., Barros, F., Vilorio, C.G., Giraldez, T., Manso, D.G., Dupuy, S.G., Miranda, P., and la Pena, P. de (2003). Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor. *FEBS Lett.* 535, 125–130.

Gong, Q., Stump, M.R., and Zhou, Z. (2011). Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by antisense morpholino oligonucleotides restores functional

expression of hERG nonsense and frameshift mutations in long-QT syndrome. *JMolCell Cardiol* 50, 223–229.

Gravante, B., Barbuti, A., Milanese, R., Zappi, I., Viscomi, C., and DiFrancesco, D. (2004). Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J. Biol. Chem.* 279, 43847–43853.

Guo, J., Gang, H., and Zhang, S. (2006). Molecular determinants of cocaine block of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 865–874.

Guo, J., Massaeli, H., Xu, J., Jia, Z., Wigle, J.T., Mesaeli, N., and Zhang, S. (2009). Extracellular K⁺ concentration controls cell surface density of IKr in rabbit hearts and of the HERG channel in human cell lines. *J. Clin. Invest.* 119, 2745–2757.

Gustina, A.S., and Trudeau, M.C. (2009). A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT syndrome mutant hERG potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13082–13087.

Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D.C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Métayer, P., and Clémenty, J. (1998). Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins. *N. Engl. J. Med.* 339, 659–666.

Haufe, V., Camacho, J.A., Dumaine, R., Günther, B., Bollensdorff, C., Banchet, G.S. von, Benndorf, K., and Zimmer, T. (2005). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J. Physiol.* 564, 683–696.

Haverkamp, W., Breithardt, G., Camm, A.J., Janse, M.J., Rosen, M.R., Antzelevitch, C., Escande, D., Franz, M., Malik, M., Moss, A., et al. (2000). The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 21, 1216–1231.

Heginbotham, L., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 258, 1152–1155.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061–1067.

Herrmann, S., Stieber, J., and Ludwig, A. (2007). Pathophysiology of HCN channels. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 454, 517–522.

Herzberg, I.M., Trudeau, M.C., and Robertson, G.A. (1998). Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J. Physiol.* 511, 3–14.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.

Hodgkin, A.L., and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108, 37–77.

Hu, D., Barajas-Martínez, H., Pfeiffer, R., Dezi, F., Pfeiffer, J., Buch, T., Betzenhauser, M.J., Belardinelli, L., Kahlig, K.M., Rajamani, S., et al. (2014). Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 66–79.

Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839–842.

Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433–442.

January, C.T., Gong, Q., and Zhou, Z. (2000). Long QT syndrome: cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 11, 1413–1418.

Jervell, A., and Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* 54, 59–68.

Kamiya, K., Niwa, R., Mitcheson, J.S., and Sanguinetti, M.C. (2006). Molecular determinants of HERG channel block. *Mol. Pharmacol.* 69, 1709–1716.

Kapa, S., Tester, D.J., Salisbury, B.A., Harris-Kerr, C., Pungliya, M.S., Alders, M., Wilde, A.A., and Ackerman, M.J. (2009). Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 120, 1752–1760.

Kapplinger, J.D., Tester, D.J., Salisbury, B.A., Carr, J.L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G.D., Wilde, A.A., and Ackerman, M.J. (2009). Spectrum and prevalence of

mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297–1303.

Keller, D.I., Grenier, J., Christe, G., Dubouloz, F., Osswald, S., Brink, M., Ficker, E., and Chahine, M. (2009). Characterization of novel KCNH2 mutations in type 2 long QT syndrome manifesting as seizures. *Can. J. Cardiol.* 25, 455–462.

Kiehn, J., Lacerda, A.E., and Brown, A.M. (1999). Pathways of HERG inactivation. *Am. J. Physiol.* 277, H199–H210.

Laish-Farkash, A., Glikson, M., Brass, D., Marek-Yagel, D., Pras, E., Dascal, N., Antzelevitch, C., Nof, E., Reznik, H., Eldar, M., et al. (2010). A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in moroccan jews. *J Cardiovasc.* 21, 1365–1372.

Lees-Miller, J.P., Kondo, C., Wang, L., and Duff, H.J. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ. Res.* 81, 719–726.

Lees-Miller, J.P., Duan, Y., Teng, G.Q., Thorstad, K., and Duff, H.J. (2000). Novel gain-of-function mechanism in K(+) channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circ. Res.* 86, 507–513.

Lees-Miller, J.P., Subbotina, J.O., Guo, J., Yarov-Yarovoy, V., Noskov, S.Y., and Duff, H.J. (2009). Interactions of H562 in the S5 helix with T618 and S621 in the pore helix are important determinants of hERG1 potassium channel structure and function. *Biophys. J.* 96, 3600–3610.

Lin, M.T., Wu, M.H., Chang, C.C., Chiu, S.N., Theriault, O., Huang, H., Christe, G., Ficker, E., and Chahine, M. (2008). In utero onset of long QT syndrome with atrioventricular block and spontaneous or lidocaine-induced ventricular tachycardia: compound effects of hERG pore-region mutation and SCN5A N-terminus variant. *Heart Rhythm* 5(11), 1567–1574.

Lolicato, M., Nardini, M., Gazzarrini, S., Moller, S., Bertinetti, D., Herberg, F.W., Bolognesi, M., Martin, H., Fasolini, M., Bertrand, J.A., et al. (2011). Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 286, 44811–44820.

Lolicato, M., Bucchi, A., Arrigoni, C., Zucca, S., Nardini, M., Schroeder, I., Simmons, K., Aquila, M., DiFrancesco, D., Bolognesi, M., et al. (2014). Cyclic

dinucleotides bind the C-linker of HCN4 to control channel cAMP responsiveness. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 457–462.

London, B., Trudeau, M.C., Newton, K.P., Beyer, A.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Satler, C.A., and Robertson, G.A. (1997). Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ. Res.* **81**, 870–878.

Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376–382.

Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., and Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* **18**, 2323–2329.

MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232–235.

Macri, V., Mahida, S.N., Zhang, M.L., Sinner, M.F., Dolmatova, E.V., Tucker, N.R., McLellan, M., Shea, M.A., Milan, D.J., Lunetta, K.L., et al. (2014). Novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.*

Maier, S.K.G., Westenbroek, R.E., Schenkman, K.A., Feigl, E.O., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2002). An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4073–4078.

Maltsev, V.A., Sabbah, H.N., Higgins, R.S., Silverman, N., Lesch, M., and Undrovinas, A.I. (1998). Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* **98**, 2545–2552.

McDonald, T.V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M.B., Wang, K.W., Goldstein, S.A., and Fishman, G.I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**, 289–292.

Mechakra, A., Vincent, Y., Chevalier, P., Millat, G., Ficker, E., Jastrzebski, M., Poulin, H., Pouliot, V., Chahine, M., and Christe, G. (2013). The variant hERG/R148W associated with LQTS is a mutation that reduces current density on co-expression with the WT. *Gene*.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D.J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M.T., et al. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134–142.

Michels, G., Er, F., Khan, I.F., Endres-Becker, J., Brandt, M.C., Gassanov, N., Johns, D.C., and Hoppe, U.C. (2008). K⁺ channel regulator KCR1 suppresses heart rhythm by modulating the pacemaker current I_f. *PLoS One* 3, e1511.

Milanesi, R., Baruscotti, M., Gneccchi-Ruscone, T., and DiFrancesco, D. (2006). Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *NEngl J Med* 354, 151–157.

Milano, A., Vermeer, A.M.C., Lodder, E.M., Barc, J., Verkerk, A.O., Postma, A.V., van der Bilt, I.A.C., Baars, M.J.H., van Haelst, P.L., Caliskan, K., et al. (2014). HCN4 Mutations in Multiple Families With Bradycardia and Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 745–756.

Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C., and Sanguinetti, M.C. (2000a). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 12329–12333.

Mitcheson, J.S., Chen, J., and Sanguinetti, M.C. (2000b). Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J. Gen. Physiol.* 115, 229–240.

Mizusawa, Y., Horie, M., and Wilde, A.A.M. (2014). Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 78, 2827–2833.

Mohler, P.J., Schott, J.-J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.-S., Haurogné, K., Kyndt, F., Ali, M.E., et al. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421, 634–639.

Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 1646–1652.

Morais Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li, M., and MacKinnon, R. (1998). Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 95, 649–655.

Moreau, A., Krahn, A.D., Gosselin-Badaroudine, P., Klein, G.J., Christe, G., Vincent, Y., Boutjdir, M., and Chahine, M. (2013). Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation. *Front Pharmacol* 4, 126.

Moriya, M., Seto, S., Yano, K., and Akahoshi, M. (2007). Two cases of short QT interval. *Pacing Clin. Electrophysiol. PACE* 30, 1522–1526.

Moss, A.J., Zareba, W., Hall, W.J., Schwartz, P.J., Crampton, R.S., Benhorin, J., Vincent, G.M., Locati, E.H., Priori, S.G., Napolitano, C., et al. (2000). Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 101, 616–623.

Much, B., Wahl-Schott, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A., and Biel, M. (2003). Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 278, 43781–43786.

Nattel, S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415, 219–226.

Nattel, S. (2011). From guidelines to bench: implications of unresolved clinical issues for basic investigations of atrial fibrillation mechanisms. *Can. J. Cardiol.* 27, 19–26.

Nof, E., Luria, D., Brass, D., Marek, D., Lahat, H., Reznik-Wolf, H., Pras, E., Dascal, N., Eldar, M., and Glikson, M. (2007). Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* 116, 463–470.

Onkal, R., Mattis, J.H., Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Shao, D., Okuse, K., and Djamgoz, M.B.A. (2008). Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of “neonatal” and “adult” isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J. Cell. Physiol.* 216, 716–726.

Pape, H.C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 299–327.

Partemi, S., Cestele, S., Pezzella, M., Campuzano, O., Paravidino, R., Pascali, V.L., Zara, F., Tassinari, C.A., Striano, S., Oliva, A., et al. (2013). Loss-of-function KCNH2 mutation in a family with long QT syndrome, epilepsy, and sudden death. *Epilepsia* 54, e112–e116.

Perrin, M.J., Subbiah, R.N., Vandenberg, J.I., and Hill, A.P. (2008). Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: function and dysfunction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **98**, 137–148.

Piper, D.R., Varghese, A., Sanguinetti, M.C., and Tristani-Firouzi, M. (2003). Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10534–10539.

Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., et al. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**, 511–519.

Postea, O., and Biel, M. (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 903–914.

Priori, S.G., Pandit, S.V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M.R., Gudapakkam, S., et al. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ. Res.* **96**, 800–807.

Prole, D.L., and Yellen, G. (2006). Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J. Gen. Physiol.* **128**, 273–282.

Robertson, G.A. (2009). Endocytic control of ion channel density as a target for cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 2531–2534.

Romano, C., Gemme, G., and Pongiglione, R. (1963). [RARE CARDIAC ARRHYTHMIAS OF THE PEDIATRIC AGE. I. REPETITIVE PAROXYSMAL TACHYCARDIA]. *Minerva Pediatr.* **15**, 1155–1164.

Ruan, Y., Liu, N., and Priori, S.G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 337–348.

Saenen, J.B., Paulussen, A.D., Jongbloed, R.J., Marcelis, C.L., Gilissen, R.A., Aerssens, J., Snyders, D.J., and Raes, A.L. (2007). A single hERG mutation underlying a spectrum of acquired and congenital long QT syndrome phenotypes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43**, 63–72.

Sanders, C.R., and Myers, J.K. (2004). Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 25–51.

Sanguinetti, M.C., and Jurkiewicz, N.K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* 96, 195–215.

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., and Keating, M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81, 299–307.

Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93, 717–729.

Schimpf, R., Bauersfeld, U., Gaita, F., and Wolpert, C. (2005). Short QT syndrome: successful prevention of sudden cardiac death in an adolescent by implantable cardioverter-defibrillator treatment for primary prophylaxis. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 2, 416–417.

Schönherr, R., and Heinemann, S.H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol.* 493, 635–642.

Schroeter, A., Walzik, S., Blechschmidt, S., Haufe, V., Benndorf, K., and Zimmer, T. (2010). Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 16–24.

Schulze-Bahr, E., Haverkamp, W., Wedekind, H., Rubie, C., Hordt, M., Borggrefe, M., Assmann, G., Breithardt, G., and Funke, H. (1997). Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum. Genet.* 100, 573–576.

Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U.B., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.* 111, 1537–1545.

Schweizer, P.A., Duhme, N., Thomas, D., Becker, R., Zehelein, J., Draguhn, A., Bruehl, C., Katus, H.A., and Koenen, M. (2010). cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 3, 542–552.

Schweizer, P.A., Schröter, J., Greiner, S., Haas, J., Yampolsky, P., Mereles, D., Buss, S.J., Seyler, C., Bruehl, C., Draguhn, A., et al. (2014). The Symptom Complex of Familial Sinus Node Dysfunction and Myocardial Noncompaction Is Associated With Mutations in the HCN4 Channel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 757–767.

Severi, S., Fantini, M., Charawi, L.A., and DiFrancesco, D. (2012). An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. *J.Physiol* 590, 4483–4499.

Shah, R.R., Bjerregaard, P., and Gussak, I. (2010). Drug-induced QT interval shortening: an emerging component in integrated assessment of cardiac safety of drugs. *J. Electrocardiol.* 43, 386–389.

Shao, C., Lu, Y., Liu, M., Chen, Q., Lan, Y., Liu, Y., Lin, M., and Li, Y. (2011). Electrophysiological study of V535M hERG mutation of LQT2. *JHuazhongUniv SciTechnologMedSci* 31, 741–748.

Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R.T., Pan, Z., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., and Cohen, I.S. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* 85, e1–e6.

Shibasaki, T. (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J. Physiol.* 387, 227–250.

Shinlapawittayatorn, K., Dudash, L.A., Du, X.X., Heller, L., Poelzing, S., Ficker, E., and Deschênes, I. (2011). A novel strategy using cardiac sodium channel polymorphic fragments to rescue trafficking-deficient SCN5A mutations. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 500–509.

Smith, P.L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833–836.

Spector, P.S., Curran, M.E., Zou, A., Keating, M.T., and Sanguinetti, M.C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J. Gen. Physiol.* 107, 611–619.

Splawski, I., Shen, J., Timothy, K.W., Lehmann, M.H., Priori, S., Robinson, J.L., Moss, A.J., Schwartz, P.J., Towbin, J.A., Vincent, G.M., et al. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102, 1178–1185.

Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., Condouris, K., et al. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19–31.

Stewart, S., Hart, C.L., Hole, D.J., and McMurray, J.J. (2001). Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart Br. Card. Soc.* 86, 516–521.

Stump, M.R., Gong, Q., and Zhou, Z. (2013). LQT2 Nonsense Mutations Generate Trafficking Defective N-Terminally Truncated Channels by the Reinitiation of Translation. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol*.

Subbiah, R.N., Clarke, C.E., Smith, D.J., Zhao, J., Campbell, T.J., and Vandenberg, J.I. (2004). Molecular basis of slow activation of the human ether-a-go-go related gene potassium channel. *J. Physiol.* 558, 417–431.

Swedberg, K., Komajda, M., Böhm, M., Borer, J.S., Ford, I., Dubost-Brama, A., Lerebours, G., Tavazzi, L., and SHIFT Investigators (2010). Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 376, 875–885.

Tan, H.L., Bink-Boelkens, M.T., Bezzina, C.R., Viswanathan, P.C., Beaufort-Krol, G.C., van Tintelen, P.J., van den Berg, M.P., Wilde, A.A., and Balser, J.R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409, 1043–1047.

Teng, S., Ma, L., Dong, Y., Lin, C., Ye, J., Bähring, R., Vardanyan, V., Yang, Y., Lin, Z., Pongs, O., et al. (2004). Clinical and electrophysiological characterization of a novel mutation R863X in HERG C-terminus associated with long QT syndrome. *J. Mol. Med.* 82, 189–196.

Thollon, C., Bedut, S., Villeneuve, N., Coge, F., Piffard, L., Guillaumin, J.P., Brunel-Jacquemin, C., Chomarat, P., Boutin, J.A., Peglion, J.L., et al. (2007). Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br. J. Pharmacol.* 150, 37–46.

Thouta, S., Sokolov, S., Abe, Y., Clark, S.J., Cheng, Y.M., and Claydon, T.W. (2014). Proline scan of the HERG channel S6 helix reveals the location of the intracellular pore gate. *Biophys. J.* 106, 1057–1069.

Torres, A.M., Bansal, P.S., Sunde, M., Clarke, C.E., Bursill, J.A., Smith, D.J., Bauskin, A., Breit, S.N., Campbell, T.J., Alewood, P.F., et al. (2003). Structure of the HERG K⁺ channel S5P extracellular linker: role of an amphipathic alpha-helix in C-type inactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 42136–42148.

Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B., and Robertson, G.A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269, 92–95.

Tu, L., and Deutsch, C. (1999). Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophys. J.* 76, 2004–2017.

Tusscher, K.H. ten, Noble, D., Noble, P.J., and Panfilov, A.V. (2004). A model for human ventricular tissue. *Am. J. Physiol.* 286, H1573–H1589.

Ueda, K., Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashiesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., et al. (2004). Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J BiolChem* 279, 27194–27198.

Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D.J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9355–9360.

Ueda, K., Hirano, Y., Higashiesato, Y., Aizawa, Y., Hayashi, T., Inagaki, N., Tana, T., Ohya, Y., Takishita, S., Muratani, H., et al. (2009). Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia. *J.Hum.Genet.* 54, 115–121.

Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y., and Hill, A.P. (2012). hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev* 92, 1393–1478.

Vatta, M., Ackerman, M.J., Ye, B., Makielski, J.C., Ughanze, E.E., Taylor, E.W., Tester, D.J., Balijepalli, R.C., Foell, J.D., Li, Z., et al. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 114, 2104–2112.

Verkerk, A.O., and Wilders, R. (2015). Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3071–3094.

Villarroel, A., Burnashev, N., and Sakmann, B. (1995). Dimensions of the narrow portion of a recombinant NMDA receptor channel. *Biophys. J.* 68, 866–875.

Viloria, C.G., Barros, F., Giraldez, T., Gomez-Varela, D., and la Pena, P. de (2000). Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K(+) channel gating. *Biophys. J.* 79, 231–246.

Viscomi, C., Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Moroni, A., and DiFrancesco, D. (2001). C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 276, 29930–29934.

Viskin, S. (2009). The QT interval: too long, too short or just right. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 6, 711–715.

Wang, J., Myers, C.D., and Robertson, G.A. (2000). Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K(+) channels. *J. Gen. Physiol.* 115, 749–758.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A., and Keating, M.T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805–811.

Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., de Jager, T., et al. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17–23.

Wang, S., Liu, S., Morales, M.J., Strauss, H.C., and Rasmusson, R.L. (1997). A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 502, 45–60.

Wang, Z., Wong, N.C., Cheng, Y., Kehl, S.J., and Fedida, D. (2009). Control of voltage-gated K⁺ channel permeability to NMDG⁺ by a residue at the outer pore. *J. Gen. Physiol.* 133, 361–374.

Ward, O.C. (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Assoc.* 54, 103–106.

Warmke, J.W., and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3438–3442.

Westenbroek, R.E., Bischoff, S., Fu, Y., Maier, S.K.G., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (2013). Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 64, 69–78.

Wijffels, M.C., Kirchhof, C.J., Dorland, R., and Allessie, M.A. (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92, 1954–1968.

Wynia-Smith, S.L., Gillian-Daniel, A.L., Satyshur, K.A., and Robertson, G.A. (2008). hERG gating microdomains defined by S6 mutagenesis and molecular modeling. *J.Gen.Physiol* 132, 507–520.

Xiao, J., Liang, D., and Chen, Y.-H. (2011). The genetics of atrial fibrillation: from the bench to the bedside. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 73–96.

Yang, T., Atack, T.C., Stroud, D.M., Zhang, W., Hall, L., and Roden, D.M. (2012). Blocking *Scn10a* channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ. Res.* 111, 322–332.

Yang, Y., Yang, Y., Liang, B., Liu, J., Li, J., Grunnet, M., Olesen, S.-P., Rasmussen, H.B., Ellinor, P.T., Gao, L., et al. (2010). Identification of a *Kir3.4* mutation in congenital long QT syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 872–880.

Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R.T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R.B., et al. (2001). MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* 88, E84–E87.

Yu, X., Duan, K.L., Shang, C.F., Yu, H.G., and Zhou, Z. (2004). Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I(h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1051–1056.

Yu, X., Chen, X.W., Zhou, P., Yao, L., Liu, T., Zhang, B., Li, Y., Zheng, H., Zheng, L.H., Zhang, C.X., et al. (2007). Calcium influx through *If* channels in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 292, C1147–C1155.

Zareba, W., and Cygankiewicz, I. (2008). Long QT syndrome and short QT syndrome. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51, 264–278.

Zareba, W., Moss, A.J., Daubert, J.P., Hall, W.J., Robinson, J.L., and Andrews, M. (2003). Implantable cardioverter defibrillator in high-risk long QT syndrome patients. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 14, 337–341.

Zhou, J., Ding, W.-G., Makiyama, T., Miyamoto, A., Matsumoto, Y., Kimura, H., Tarutani, Y., Zhao, J., Wu, J., Zang, W.-J., et al. (2014). A novel *HCN4* mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 78, 938–942.

Zhou, Z., Gong, Q., Ye, B., Fan, Z., Makielski, J.C., Robertson, G.A., and January, C.T. (1998). Properties of *HERG* channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys. J.* 74, 230–241.