



HAL
open science

Analyses fonctionnelles de mutations du gène SCN5A impliquées dans le syndrome de Brugada

Jérôme Clatot

► **To cite this version:**

Jérôme Clatot. Analyses fonctionnelles de mutations du gène SCN5A impliquées dans le syndrome de Brugada. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066012 . tel-00828454

HAL Id: tel-00828454

<https://theses.hal.science/tel-00828454>

Submitted on 3 Jun 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

« PIERRE ET MARIE CURIE »

Ecole doctorale « Complexité du Vivant » ED-515

Spécialité

Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

M. Jérôme CLATOT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Analyses fonctionnelles de mutations du gène *SCN5A* impliquées
dans le syndrome de Brugada**

Soutenue le 29 Mars 2012

Devant le Jury composé de :

Dr Bertrand Fontaine

Président du Jury

Dr Isabelle Baró

Rapporteur

Dr Rodolphe Fischmeister

Rapporteur

Dr Nour Eddine Lomri

Examineur

Dr Pascale Guicheney

Directrice de thèse

Dr Nathalie Neyroud

Co-encadrante

Remerciements

Je remercie le Dr Pascale Guicheney et le Dr Nathalie Neyroud de m'avoir fait confiance pour mener ce projet à bien. Je remercie le Dr Alain Coulombe pour sa disponibilité. Merci à vous trois pour votre dynamisme, votre pédagogie, votre encadrement, vos conseils et votre soutien durant ces trois années riches d'enseignement.

Je remercie le Dr Stéphane Hatem de m'avoir accueilli au sein de cette unité.

Je remercie le Dr Azza Ziyadeh-Isleem, Svetlana Maugenre et Gilles Dilanian pour leur implication dans ce projet, le Dr Hideki Itoh pour ses cours et le Dr Rachel Peat pour ses relectures.

Aussi je tiens à remercier toute cette équipe dynamique, Alexia Vite, Dr Eric Villard, Agathe Korniat, Façoise Gary, Myriam Berthet et Darouna Kattygnarath, pour vos conseils, votre aide et tous les moments de convivialité et d'échanges.

Merci à Marie toujours présente pour me soutenir.

Enfin, merci au Jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je dédie ce travail à mes parents

Sommaire

Avant propos	5
Introduction.....	7
I. Le cœur.....	7
A/ Anatomie	7
B/ Le potentiel d'action initiateur de la contraction cardiaque.....	7
C/ Le couplage excitation-contraction	8
D/ La propagation du potentiel d'action, un substrat pour les arythmies.....	9
II. Le syndrome de Brugada (SBr)	11
A/ Historique	11
B/ Epidémiologie du syndrome de Brugada.....	12
C/ Génétique du syndrome de Brugada.....	12
D/ Phénotypes cliniques du syndrome de Brugada	13
E/ Rôle de la perte du courant I_{Na} dans l'élévation du segment ST.....	14
E.1/ Hypothèse de la repolarisation précoce	14
E.2/ Hypothèse de la dépolarisation retardée	16
III. La sous-unité α du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$.....	19
A/ Evolution des canaux sodiques dépendants du potentiel à l'origine des tissus excitables	21
A.1/ Evolution de la sélectivité du pore	23
A.2/ Evolution de l'inactivation rapide.....	25
A.3/ La famille des canaux sodiques $Na_v1.X$ chez les mammifères.....	27
B/ Le canal sodique cardiaque dépendant du potentiel, $Na_v1.5$	31
B.1/ Les isoformes du canal sodique $Na_v1.5$	31
B.2/ Structure du canal sodique $Na_v1.5$	33
C/ La partie N-terminale des canaux sodiques dépendants du potentiel.....	38
D/ Régions de régulation post-traductionnelle.....	40
IV. Les sous-unités $Na_v\beta$: structure et fonctions	41
A/ Les sous-unités $Na_v\beta1$ et $Na_v\beta1B$	42
B/ La sous-unité $Na_v\beta2$	45
C/ La sous-unité $Na_v\beta3$	46
D/ La sous-unité $Na_v\beta4$	48
V. Les partenaires du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$	50
A/ Les protéines d'ancrage ou adaptatrices.....	51
A.1/ L'ankyrine-G / syndrome de Brugada de type 8.....	51
A.2/ La syntrophine $\alpha1$ / SQT1 de type 12	51
A.3/ La SAP97	53
A.4/ MOG1 / syndrome de Brugada de type 11.....	53
A.5/ L'alpha-actinine-2	54

B/ Les Enzymes	54
B.1/ L'ubiquitine ligase Nedd4	54
B.2/ La CAMKII	55
B.3/ La protéine Tyrosine Phosphatase PTPH1	57
C/ Les protéines capables de modifier les propriétés biophysiques du canal	57
C.1/ La protéine 14-3-3η	57
C.2/ La cavéoline-3 / SQTL type 9.....	58
C.3/ FHF1B ou FGF12-1b	59
C.4/ La calmoduline	60
C.5/ La protéine GPD1L / syndrome de Brugada de type 2	61
C.6/ La téléthonine	62
C.7/ La plakophiline-2.....	62
D/ Conclusions sur les partenaires et perspectives	63
VI. Objectifs du travail de thèse :.....	63
Résultats.....	65
I. Etude fonctionnelle de mutations de la partie N-terminale du canal sodique Na_v1.5	65
A/ Résumé de l'article soumis pour publication : "Dominant-negative suppression of the cardiac sodium channel by N-terminal mutations"	65
A.1/ Introduction :	65
A.2/ Résultats :	65
A.3/ Conclusion :	67
A.4/ Article :.....	68
B/ Implication de la partie N-terminale dans la fonction du canal sodique cardiaque.....	96
II. Etude fonctionnelle d'une mutation induisant la formation d'un codon stop prématuré dans la partie C-terminale de Na_v1.5	100
A/ Introduction	100
B/ Résultats	101
Discussion	104
I. Etude fonctionnelle de la partie N-terminale du canal sodique Na_v1.5	104
II. Discussion préliminaire sur l'étude fonctionnelle du canal R1860GfsX12-Na_v1.5.....	110
Conclusion	112
Bibliographie.....	114

Lexique des abréviations

AA : acide Aminé
ADNc : Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
CAM : Cell Adhesion Molecule
CaM : Calmoduline
CAMKII : Calmoduline kinase II dépendante du Ca^{2+}
CBD : Calmodulin Binding Domain pour domaine de liaison à la calomoduline
CCD : trouble de la conduction cardiaque (Cardiac conduction disease)
CHO : Chinese Hamster Ovary
DNS : Dysfonction du Nœud Sinusal ou maladie du nœud sinusal (SSS pour Sick Sinus Syndrome)
ECG : Electrocardiogramme
FA : Fibrillation Atriale
FHF1B : Facteur 1B homologue au facteur de croissance du fibroblaste
GPD1L : Glycerol-3-Phosphate Deshydrogenase 1-Like
HEK : Human Embryonic Kidney
MSI : Mort subite infantile (SIDS Sudden Infantile death Syndrome)
NOS : Nitrique Oxyde Synthase
PA : Potentiel d'Action
PDZ : acronyme de Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), et Zonula occludens-1 protein (zo-1) qui furent les premières protéines découvertes à partager ce même domaine.
PMCA4b : Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase 4b
PTPH1 : Protéine Tyrosine Phosphatase H1
RE : Réticulum Endoplasmique
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RVOT : chambre de chasse du ventricule droit (Right Ventricular Outflow Track)
RyR2 : Récepteur de la ryanodine (Ryanodine 2 Receptor)
SAP97 : Synapse Associated Protein 97 pour protéine associée aux synapses
SBr : Syndrome de Brugada
SQTL : Syndrome du QT-long
UPR : Réponse aux protéines mal repliées (Unfolded Protein Response)
UTR : Région non traduite (Untranslated Region)

Liste des figures :

- Figure 1 : Coupe du cœur et potentiel d'action cardiaque
- Figure 2 : Les différents courants du potentiel d'action cardiaque
- Figure 3 : La propagation du potentiel d'action, un substrat pour les arythmies
- Figure 4 : Elévation du segment ST sur l'électrocardiogramme
- Figure 5 : Repolarisation précoce de la phase plateau du potentiel d'action
- Figure 6 : Perte de la phase plateau du potentiel d'action chez le chien
- Figure 7 : Retard de la dépolarisation dû à une perte de fonction de $Na_v1.5$
- Figure 8 : Domaines fonctionnels du canal $Na_v1.5$
- Figure 9 : Quelques mutations de $Na_v1.5$ impliquées dans les arythmies cardiaques
- Figure 10 : Arbre phylogénique des canaux Na_v et Ca_v
- Figure 11 : Evolution du motif de sélectivité pour le sodium
- Figure 12A : Structure de la porte d'inactivation
- Figure 12B : Une porte d'inactivation très conservée au cours de l'évolution
- Figure 13 : Arbre phylogénique des canaux Na_v chez le rat
- Figure 14 : Les variants d'épissage du canal sodique $Na_v1.5$
- Figure 15 : Structure tridimensionnelle des canaux $Na_v1.X$ résolue par microscopie cryoélectronique
- Figure 16 : Structure du pore du canal sodique bactérien Na_vAb
- Figure 17 : Représentation schématique de l'activité du canal $Na_v1.5$ en fonction de la dépolarisation et de la repolarisation cellulaires
- Figure 18 : Structure tridimensionnelle hélice-boucle-hélice de la partie C-ter de $Na_v1.5$
- Figure 19 : Homologie de séquence de la partie N-terminale des canaux $Na_v1.X$
- Figure 20 : Structure de la sous-unité $Na_v\beta1$
- Figure 21 : Mutations répertoriées dans les différentes sous-unités $Na_v\beta$
- Figure 22 : Les partenaires connus de $Na_v1.5$
- Figure 23 : Mécanisme d'inactivation lente par FHF
- Figure 24 : Les différentes constructions du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$
- Figure 25 : Etudes électrophysiologiques du canal Δ -Nter- $Na_v1.5$
- Figure 26 : Effet du fragment N-terminal sur la fonction du canal $Na_v1.5$
- Figure 27 : Perte de fonction du mutant R1860fsX12
- Figure 28 : Gain de fonction du mutant R1860fsX12

Liste des tableaux :

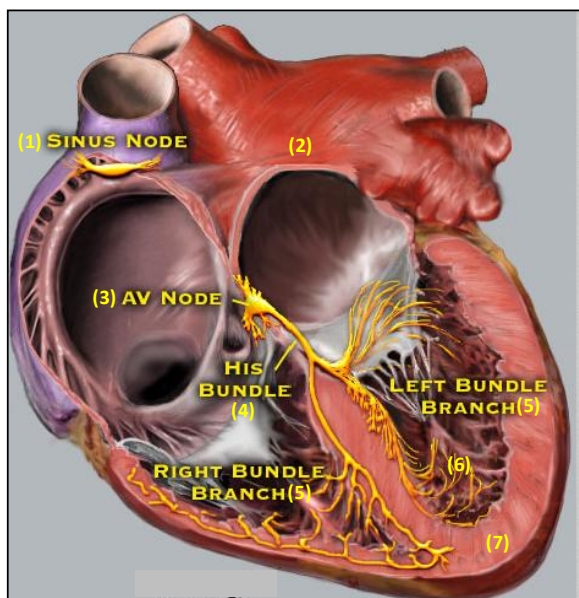
- Tableau 1 : Gènes impliqués dans le syndrome de Brugada
- Tableau 2 : Les canaux sodiques humains
- Tableau 3 : Effets des sous unités β sur I_{Na}
- Tableau 4 : Les partenaires connus de $Na_v1.5$
- Tableau 5 : Propriétés biophysiques du canal R1860fsX12

Avant propos

Les canaux sodiques dépendants du potentiel (Na_v) jouent un rôle majeur dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action des cellules excitables. La conduction d'un courant électrique se propageant d'une cellule à l'autre a été un élément primordial de l'innovation au cours de l'évolution. La communication intercellulaire sur de longues distances grâce aux canaux ioniques a accompagné l'apparition de structures de plus en plus complexes telles que le système nerveux et le système musculaire des mammifères. Les canaux ont évolué sous l'influence d'une pression de sélection qui a privilégié l'apparition des fonctions majeurs des canaux $\text{Na}_v1.X$: (1) une sélectivité ionique, (2) une activation dépendante du potentiel, (3) une inactivation rapide. Chacune de ces fonctions est possible grâce à des structures très conservées des protéines qui sont des cibles pour l'apparition de mutations et sont donc impliquées dans de nombreuses canalopathies. La partie N-terminale des canaux Na_v fait partie de ces régions conservées dans lesquelles des mutations entraînent une perte totale de fonction qui semble être la cause de pathologies du système nerveux comme l'ataxie, l'épilepsie, ou cardiaques comme le syndrome du QT long (SQTL), le syndrome de Brugada (SBr) ; pourtant sa fonction reste encore inconnue.

Ce travail de thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle de la partie N-terminale du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$, et les conséquences de certaines mutations de cette région menant à des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire et au syndrome de Brugada.

Figure 1 : Coupe du cœur et potentiel d'action cardiaque



(1) Nœud Sinusal

(2) Muscle auriculaire

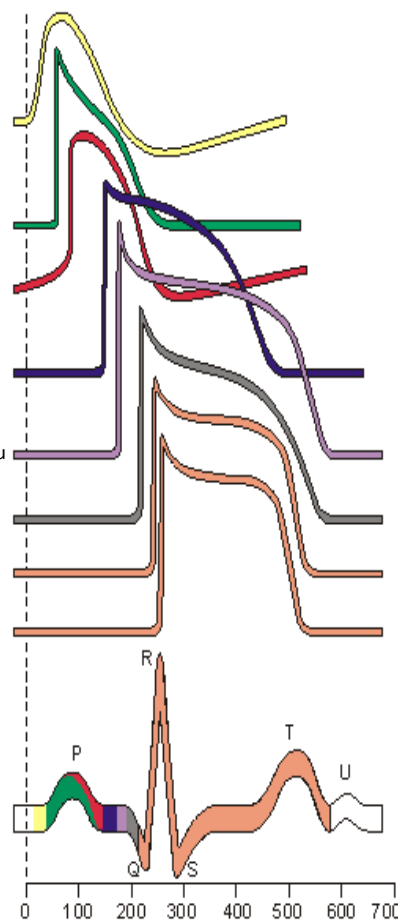
(3) Nœud auriculo-ventriculaire

(4) Faisceau de His

(5) Branches du faisceau de His

(6) Fibres de Purkinje

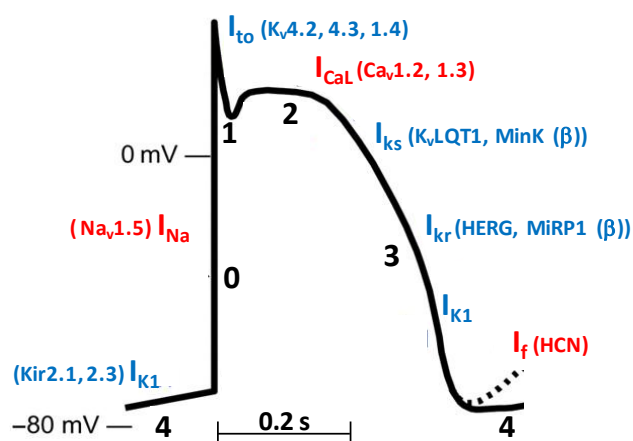
(7) Muscle ventriculaire



Modifié de: <http://www.blaufuss.org/SVT/index2.html>

Représentation du cœur et des différentes formes de potentiel d'action cardiaque. La résultante des potentiels d'action du nœud sinusal au nœud auriculo-ventriculaire forme l'onde P de l'électrocardiogramme. La dépolarisation des ventricules forme le complexe QRS sur l'électrocardiogramme. L'onde T correspond à la repolarisation des ventricules.

Figure 2 : Les différents courants du potentiel d'action cardiaque



Représentation schématique du potentiel d'action cardiaque. Les noms des courants ioniques notés en rouge ou en bleu précisent s'il s'agit d'un courant entrant (dépolarisant) ou sortant (repolarisant). Les canaux responsables des différents courants sont notés entre parenthèses. Les numéros représentent les 4 phases du potentiel d'action.

Modifié de Georghia et coll. Cardiovasc Res 2009

Introduction

I. Le cœur

A/ Anatomie

Le cœur est divisé en trois étages fonctionnels : un étage auriculaire et un étage ventriculaire, constituant la composante musculaire, et un étage artériel (artère pulmonaire et aorte). Le rôle du cœur est de permettre la circulation du sang, apportant aux organes oxygène et nutriments. La fonction de cette pompe se décompose en quatre étapes séquentielles : (1) la diastole auriculaire, pendant laquelle le sang entre dans les oreillettes, (2) la systole auriculaire, qui est un phénomène de contraction des oreillettes permettant de faire passer le sang à travers les valves auriculo-ventriculaires et de mettre les ventricules sous pression, (3) la systole ventriculaire, qui est un phénomène de grande pression et permet de faire passer le sang des ventricules aux artères aortique et pulmonaire capables de se dilater pour recevoir un flux sanguin important. (4) La fermeture des valves aortiques et pulmonaires empêche le reflux sanguin.

La systole est un phénomène de contraction musculaire. Elle est initiée par un courant électrique généré par un mouvement d'ions entre l'extérieur et l'intérieur des cellules musculaires. Ce mouvement est possible grâce aux canaux dépendants du potentiel, sélectifs d'une espèce ionique, qui sont enchâssés dans la membrane plasmique. Ces canaux sont responsables de la dépolarisation puis de la repolarisation de la membrane des cellules excitables, et génèrent ainsi le potentiel d'action.

B/ Le potentiel d'action initiateur de la contraction cardiaque

L'électrocardiogramme de surface (ECG) est la résultante des potentiels d'actions cardiaque (Figure 1), eux mêmes orchestrés par le fonctionnement de nombreux canaux (Figure 2). Les différentes formes de potentiels d'action sont dues à des différences d'expression « régionales » des canaux au sein du myocarde, et jouent un rôle majeur dans la stabilité et la propagation du potentiel d'action à travers le mur ventriculaire (Figure 3 f,g,h). Un dérèglement de la balance des courants ioniques est considéré comme étant le principal substrat des arythmies cardiaques [1]. Ainsi, l'expression des canaux et la forme du potentiel d'action qui en résulte sont spécifiques d'une région anatomique (Figure 1). Par exemple, l'expression de certains canaux spécifique aux cellules P (Pace-maker) du

nœud sinusal, qui sont responsables de l'automatisme cardiaque, de se dépolariser sans aucune influence externe. Ou encore de moduler la vitesse de propagation du potentiel d'action selon la région anatomique à dépolariser.

Dans le ventricule, le potentiel de repos des cardiomyocytes est compris entre -80 et -95 mV (Figure 2). Le seuil d'activation du canal sodique cardiaque, $Na_v1.5$ est d'environ -60mV. Le courant I_{Na} qui en résulte (phase 0), permet un intense influx d'ions sodium entrant dans la cellule, dépolarisant la membrane à une vitesse d'environ 300 V/s ce qui correspond à la vitesse de dépolarisation maximum du potentiel d'action (dV/dt_{max}), pour atteindre environ +40mV. Puis, le canal sodique s'inactive pour laisser place au courant I_{to} généré par les canaux potassiques ($K_v4.2$, 4.3 et 1.4) constituant la partie appelée « encoche » du potentiel d'action (phase 1). Il s'ensuit une lente activation du canal calcique dépendant du potentiel ($Ca_v1.2$) générant le courant I_{ca} et de canaux potassiques générant le courant I_{ks} . Il se met alors en place une balance entre le flux de calcium entrant et le flux de potassium sortant qui constitue le plateau du potentiel d'action (phase 2). Ce plateau est maintenu par le calcium provenant du réticulum sarcoplasmique. Enfin, la fermeture des canaux calciques mène à la repolarisation, qui constitue la phase 3 du potentiel d'action. Les canaux potassiques générant le courant I_{ks} restent ouverts et les canaux responsables du courant I_{kr} puis I_{k1} s'activent, générant une phase d'hyperpolarisation avant le retour au potentiel de repos (phase 4) (Figure 2) [2].

Le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ joue un rôle primordial car il est responsable de l'initiation du potentiel d'action et donc de sa propagation, mais aussi de la durée de celui-ci. En effet, une partie de ces canaux peut se rouvrir durant la phase de plateau du potentiel d'action générant ainsi un courant entrant tardif [3]. Une perte de fonction du canal sodique peut, d'une part, altérer la vitesse de dépolarisation d'un myocyte (dV/dt_{max}) et par voie de conséquence ralentir la vitesse de propagation du potentiel d'action au sein du myocarde, et d'autre part, engendrer une repolarisation plus précoce. Le retard de dépolarisation et la repolarisation précoce sont les hypothèses émises pour expliquer le syndrome de Brugada et feront l'objet du chapitre II.E.

C/ Le couplage excitation-contraction

La dépolarisation due à l'ouverture du canal sodique permet l'ouverture du canal Ca^{2+} dépendant du potentiel ($Ca_v1.2$). Le Ca^{2+} entre dans la cellule et se fixe sur le canal calcique RyR2 (le récepteur de la ryanodine) présent dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'ouverture de ce dernier permet une libération massive de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, ainsi la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} peut être multipliée par mille et passer de 0.1 μ M à 0.1mM. Ce mécanisme est

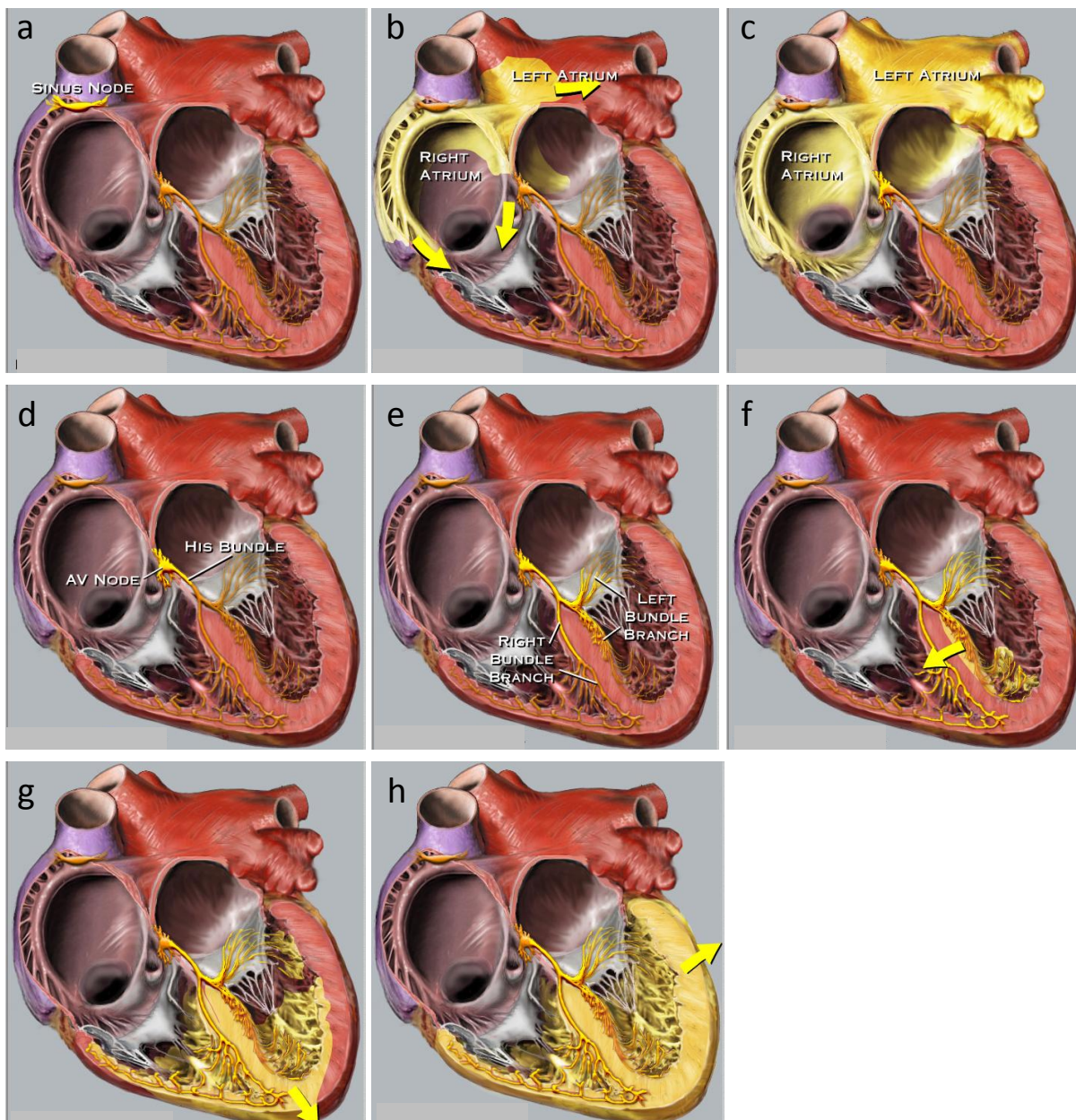
appelé "calcium Induced calcium release" pour "Libération du calcium induite par le calcium". Au repos, le complexe tropomyosine/troponine masque le site d'interaction entre actine et myosine, lorsque la teneur en Ca^{2+} du cytoplasme dépasse $10 \mu\text{M}$, la troponine C fixe 4 atomes de Ca^{2+} et libère le site d'interaction entre l'actine et la myosine, permettant le mouvement de la myosine le long de l'actine grâce à l'hydrolyse d'ATP. La contraction conduit au raccourcissement des sarcomères et au rapprochement des stries Z. Elle prend fin lorsque la concentration en Ca^{2+} retrouve sa valeur de repos ($0.1 \mu\text{M}$) [4, 5].

D/ La propagation du potentiel d'action, un substrat pour les arythmies

La vitesse de propagation du potentiel d'action joue un rôle primordial dans le syndrome de Brugada. L'impulsion cardiaque a pour origine le nœud sinusal situé dans l'épicaire de l'oreillette droite sous la veine cave supérieure (Figure 3a). Ce nœud, aussi appelé nœud de Keith et Flacks est constitué des cellules P (pace-maker) qui sont le support de l'automatisme cardiaque et battent à la fréquence la plus élevée. Le nœud sinusal initie donc le processus de dépolarisation des oreillettes droite puis gauche (Figure 3b, c). La dépolarisation de celles-ci à la vitesse d'environ 90 cm/s est représentée par l'onde P sur l'ECG. La propagation continue de façon nettement plus lente à travers le nœud auriculo-ventriculaire (Nœud d'Aschoff-Tawara), puis s'accélère dans le faisceau de His à la vitesse d'environ 2 m/s pour gagner les branches du faisceau de His (Figure 3d) : la branche droite qui reste compacte sur une grande partie de son trajet, la branche gauche qui, après un trajet compact de 1 à 2 mm , se divise finalement en deux faisceaux, l'un antérieur l'autre postérieur (Figure 3e). Finalement, chaque branche se divise en réseau de Purkinje (Figure 3d). Il est important de noter que toutes ces formations sont sous-endocardiques. En effet, l'activation ou dépolarisation myocardique ventriculaire (QRS de l'ECG) se fait de l'endocarde vers l'épicaire, à raison de 1 à 2 m/s dans les deux tiers sous-endocardiques et de 0.3 à 0.4 m/s dans le dernier tiers sous-épicaire (Figure 3 g et h flèche jaune). Classiquement, la première électronegativité apparaît sous l'endocarde septal gauche (flèche jaune Figure 3f), au tiers moyen du septum créant l'onde Q dans la dérivation précordiale I, II et R dans la III. Il s'ensuit la dépolarisation apicale créant l'onde R dans les dérivations I, II, et III. Enfin, la dépolarisation du ventricule gauche crée l'onde S en dérivation III et accroît l'onde R dans les deux premières dérivations.

Ainsi, la propagation du potentiel d'action dans le myocarde suit une voie très précise à une vitesse spécifique de la région anatomique traversée. Elle est régulée par l'expression des canaux dans chaque type cellulaire, et le canal sodique cardiaque, $\text{Na}_v1.5$, joue un rôle majeur dans ce phénomène. Toute perturbation de ce cycle, tant dans la vitesse que dans la voie qu'emprunte la

Figure 3 : La propagation du potentiel d'action, un substrat pour les arythmies



Modifié de: <http://www.blaufuss.org/SVT/index2.html>

Le cycle de dépolarisation cardiaque est présenté en jaune de a à h. Les flèches représentent la direction de la dépolarisation. Toute perturbation de ce cycle, tant dans la vitesse que dans la voie qu'emprunte la dépolarisation, peut être arythmogène. Les mutations impliquant des pertes de fonction de $Na_v1.5$ retardent la vitesse de dépolarisation et peuvent être à l'origine du syndrome de Brugada.

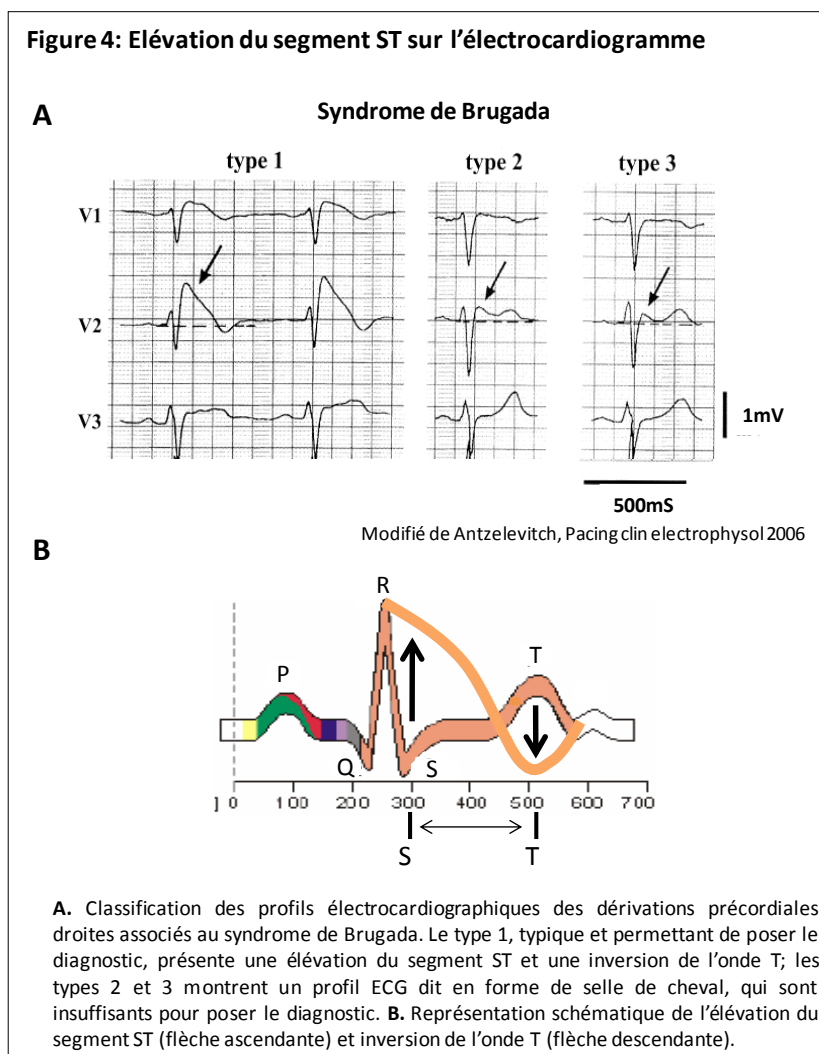
dépolarisation, peut être arythmogène. Par ailleurs, la fréquence cardiaque peut être régulée par le système nerveux extrinsèque, qui fait appel au système nerveux sympathique (cardioaccélérateur) et parasympathique (cardiomodérateur). Tous deux, peuvent dans certains cas, à l'effort ou au repos, favoriser la fibrillation ventriculaire [6]. Aussi, nous verrons plus en détail dans le chapitre suivant, les

spécificités arythmiques et électrocardiographiques du syndrome de Brugada dans le cadre d'une perte de courant I_{Na} .

II. Le syndrome de Brugada (SBr)

A/ Historique

Osher et Wolff ont été les premiers en 1953 à identifier un profil électrocardiographique particulier, comprenant un aspect de bloc de branche droit, un sus-décalage du segment ST et une inversion de l'onde T dans les dérivations précordiales droites V1 à V3 chez des sujets asymptomatiques [7] (Figure 4). Ils conclurent que des anomalies structurales pourraient être responsables de ce profil électrocardiographique. En 1993, Martini, B et coll. ont retrouvé ce profil électrocardiographique particulier chez trois patients victimes de mort subite et ont suggéré un lien possible entre ces anomalies de la repolarisation ventriculaire et la mort subite [8].



En 1992, les frères Brugada furent les premiers à émettre l'hypothèse qu'il s'agissait d'une maladie fonctionnelle et ils ont suggéré que le mécanisme physiopathologique responsable des arythmies ventriculaires était une réentrée fonctionnelle due à une dispersion de repolarisation dans le myocarde ventriculaire. L'origine fonctionnelle de ce syndrome était renforcée par l'observation d'anomalies électrocardiographiques variables dans le temps et présentes de façon inconstante [9]. Le système nerveux autonome et les médicaments antiarythmiques modulaient l'importance du sus-décalage du segment ST. Ils décrivent ces anomalies électrocardiographiques particulières dans un sous-groupe de patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique. Parmi eux, huit patients avaient présenté des épisodes de syncope ou de mort subite ressuscitée causée par des arythmies ventriculaires et chez 4 des 8 patients décrits, une histoire familiale était suspectée [10].

B/ Epidémiologie du syndrome de Brugada

Viskin et coll. ont trouvé que la prévalence de ce syndrome parmi les patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique était de 21% [11]. Corrado et coll. ont retrouvé le profil électrocardiographique particulier chez 14% des sujets jeunes victimes d'une mort subite [12]. En 1999, Allings et Wilde ont fait un bilan des cas rapportés dans la littérature jusqu'en 1998. Parmi les 163 cas décrits correspondant aux critères diagnostiques du SBr, le nombre d'hommes atteints (n=150) était nettement supérieur au nombre de femmes (n=13) [13]. De plus, parmi les patients, 58% étaient d'origine asiatique. L'âge du premier événement arythmique variait de 22 à 65 ans [13]. L'étude de la distribution de la maladie en fonction de l'âge a montré que 75% des patients étaient âgés de 30 à 40 ans [14], mais que des arythmies pouvaient néanmoins se produire exceptionnellement chez des enfants et des nouveau-nés [15]. Une histoire familiale de syncope, de fibrillation ventriculaire documentée ou de mort subite d'origine cardiaque était rapportée chez 22% des patients [13]. Le caractère apparemment héréditaire de cette entité pathologique suggérait fortement l'implication de facteurs génétiques. Selon les auteurs, ce syndrome pouvait donc être provoqué par une anomalie électrique, ou être une forme subclinique d'une cardiomyopathie héréditaire diffuse.

C/ Génétique du syndrome de Brugada

Ce syndrome se transmet selon un mode autosomique dominant, avec une pénétrance partielle. A ce jour, 12 gènes ont été impliqués dans la maladie, comprenant celui du canal sodique cardiaque, de certains de ses partenaires, ou d'autres canaux (Tableau 1) [16, 17]. L'implication de *SCN5A* dans le SBr a été suggérée pour la première fois à la suite d'une approche gène candidat. Chen et coll. en 1998 [18] ont identifié dans trois familles atteintes du SBr, trois mutations dans le

gène *SCN5A* codant pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque. Une étude réalisée sur 200 patients atteints du SBr a permis d'identifier chez 22% d'entre eux des mutations sur le gène *SCN5A* [19]. Le génotypage des membres asymptomatiques de leurs familles révéla que 46% d'entre eux étaient porteurs des mutations identifiées chez les patients. La démonstration génétique de l'implication de *SCN5A* dans ce syndrome fut réalisée par Grant et coll. lors de l'étude d'une grande famille atteinte du SBr sur quatre générations [20]. Ce syndrome se transmet de façon autosomique dominante, les mutations identifiées coségrégant dans la grande majorité des cas avec la maladie. Il y a aujourd'hui plus de 300 mutations décrites dans le gène *SCN5A* induisant une perte de fonction [21-23]. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations ont été étudiées par l'expression des canaux sodiques mutants dans des systèmes d'expression hétérologue [24].

Tableau 1: Gènes impliqués dans le syndrome de Brugada

Etude	Type	Locus	Courant	Gène	Protéine	%
Chen et coll. 1998	SBr1	3p21	I_{Na}	<i>SCN5A</i>	$Na_v1.5$	20%
London et coll. 2007	SBr2	3p24	I_{Na}	<i>GPD1L</i>	GPD1L	Rare
Antzelevitch et coll. . 2007	SBr3	12p13.3	I_{Ca}	<i>CACNA1C</i>	$Ca_v1.2$	< 5%
Antzelevitch et coll. 2007	SBr4	10p12.33	I_{Ca}	<i>CACNB2b</i>	$Ca_v\beta2b$	< 5%
Watanabe et coll. 2008	SBr5	19q13.1	I_{Na}	<i>SCN1B</i>	$Na_v\beta1$	1%
Delpón et coll. 2008	SBr6	11q13-q14	I_{to}	<i>KCNE3</i>	MiRP2	Rare
Hu et coll. 2009	SBr7	11q23.3	I_{Na}	<i>SCN3B</i>	$Na_v\beta3$	Rare
Ueda et coll. 2009	SBr8	15q24	I_f	<i>HCN4</i>	HCN4	<5%
Giudicessi et coll. 2011	SBr	1p13.3	I_{to}	<i>KCND3</i>	$K_v4.3$	NC
Ohno et coll. 2011	SBr	Xq22.3	I_{to}	<i>KCNE1L</i>	KCNE5	NC
Kattynarath et coll. 2011	SBr	17q13.1	I_{Na}	<i>RANGRF</i>	MOG1	NC
Barajas-Martinez et coll. 2011	SBr	12p11.23	I_{KATP}	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	NC

D/ Phénotypes cliniques du syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada est responsable de fibrillation ventriculaire et de mort subite. La prévalence du SBr est estimée entre 3 et 5 pour 10000 personnes. L'âge moyen du premier évènement est approximativement 40 ans mais la mort subite peut affecter des patients de tous âges, particulièrement les hommes (environ 75% des cas), qui ont dans 20 à 50% des cas une histoire familiale de mort subite. De nombreux mécanismes sont mis en cause en ce qui concerne les mutations *SCN5A*, incluant une altération du transport à la membrane, des protéines tronquées, une inactivation plus rapide du canal, un décalage de l'activation dépendante du potentiel, un ralentissement du retour à un état activable du canal. Néanmoins, il a été montré que des patients provenant de grandes familles affectées (5 familles sur 13 avec au moins 4 personnes affectées) ne portaient pas la mutation familiale responsable de la maladie. Ces observations peuvent être

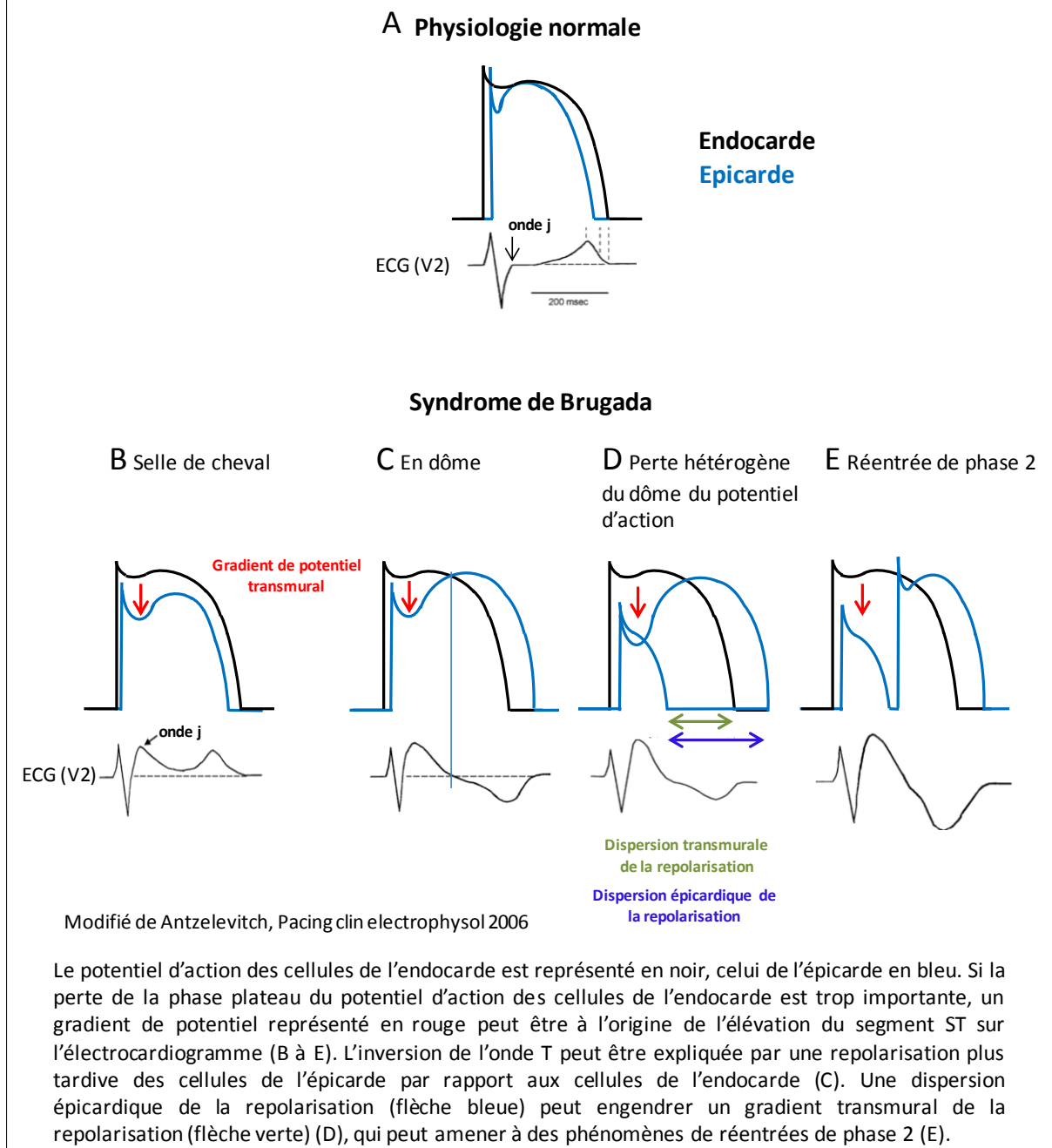
expliquées par les phénocopies (phénotype provoqué par l'environnement, mimant le phénotype héréditaire) mais pourraient aussi être expliquées par la présence d'une surface de ralentissement de la conduction dans la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT pour Right Ventricular Outflow Track) constituant un substrat anatomique pour les phénomènes de réentrées. Apparemment, chez certains individus, la surface de ralentissement serait suffisante pour provoquer la maladie de façon spontanée, en l'absence d'une mutation dans *SCN5A*. Néanmoins, dans la majorité des cas ce substrat anatomique serait associé à un fort rôle modificateur de mutations perte de fonction de *SCN5A* [25]. Dans tous les cas, ces observations posent des questions sur le rôle direct causal des mutations dans $I_{NaV1.5}$ [26] et montrent qu'il faut rester prudent quant à l'interprétation des mutations de *SCN5A* dans le cadre du conseil génétique. De plus, la corrélation génotype-phénotype est limitée du fait de la faible prévalence des patients portant des mutations et de la pénétrance variable des mutations.

E/ Rôle de la perte du courant I_{Na} dans l'élévation du segment ST

E.1/ Hypothèse de la repolarisation précoce

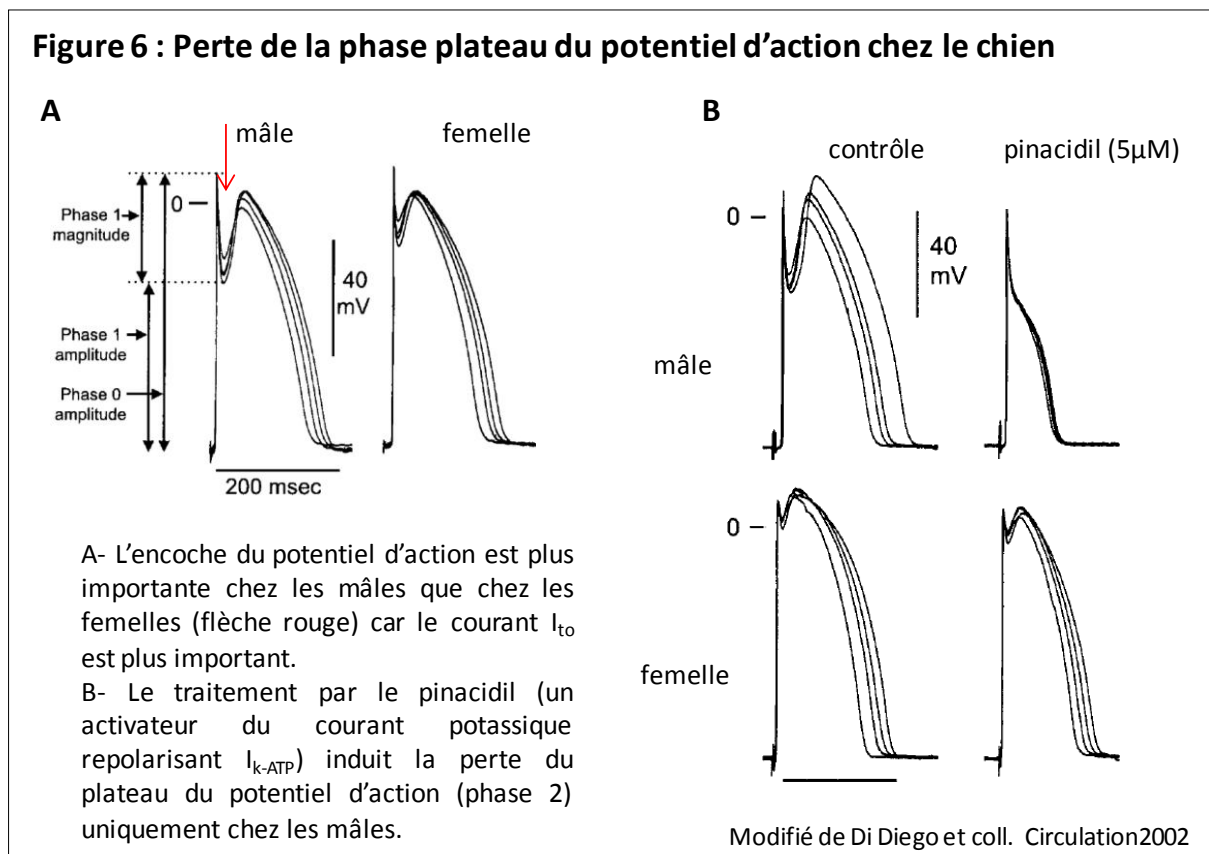
Il existe un gradient d'expression croissant des canaux potassiques $K_{v4.2}$, $K_{v4.3}$ et $K_{v1.4}$, à travers le mur ventriculaire entre les cellules de l'endocarde et les cellules de l'épicarde, plus spécifiquement dans la chambre de chasse du ventricule droit [27]. Ces trois canaux à l'origine du courant repolarisant I_{to} sont responsables de la forme en encoche (spike and dome) plus spécifique du potentiel d'action des cellules de l'épicarde de cette région anatomique. Dans des conditions normales, la prépondérance du courant I_{to} dans l'épicarde par rapport à l'endocarde donne naissance à un petit courant transmural qui coïncide avec l'onde J de l'ECG (Figure 5A). En revanche, dans des conditions pathologiques (hypothermie, hypercalcémie), l'encoche du potentiel d'action de l'épicarde peut s'accroître et entraîner la perte du plateau du potentiel d'action, un phénomène plus important dans l'épicarde (dû à un courant I_{to} plus important) que dans l'endocarde. Cette différence de repolarisation entre l'endocarde et l'épicarde provoque un gradient de potentiel transmural durant la phase de repolarisation qui serait à l'origine du sus-décalage du segment ST à l'ECG (Figure 5B à E flèche rouge) [28]. La perte du plateau du potentiel d'action est due essentiellement au déséquilibre entre les courants fonctionnant pendant la phase 2 du potentiel d'action. En théorie, une réduction des courants entrants I_{Na} ou I_{CaL} , ou une augmentation des courants sortants tels que I_{to} ou I_{K-ATP} ou I_{Kach} peut contribuer à la perte du plateau de potentiel d'action [27, 28].

Figure 5 : Repolarisation précoce de la phase plateau du potentiel d'action



Il est intéressant de noter que cette hypothèse est en accord avec la prédominance du SBr chez les hommes, due à une expression plus importante des canaux potassiques ($K_v4.2$, $K_v4.3$, $K_v1.4$) par rapport à celle mesurée chez les femmes. Antzelevitch et coll. montrent que chez le chien, la présence plus importante du courant repolarisant I_{to} chez les mâles les prédispose naturellement à une perte plus importante de la phase 2 (Figures 6A et B), impliquant une dispersion de la repolarisation fournissant le substrat nécessaire à des réentrées de phase 2 (Figure 5 D et E), pouvant

provoquer des fibrillations ventriculaires [29]. Enfin chez le rat, les femelles gestantes présentent une diminution du courant I_{to} due à une baisse de l'expression de $K_v4.3$ associée à une augmentation des œstrogènes, suggérant le rôle de ces hormones dans la régulation des canaux ioniques et les



variabilités électrocardiographiques [29, 30].

E.2/ Hypothèse de la dépolarisation retardée

Une seconde hypothèse a été émise suggérant qu'un retard de conduction dans le ventricule droit serait à l'origine du SBr [31] [25, 32]. En effet, la chambre de chasse du ventricule droit est le lieu d'insertion du système vasculaire artériel dans le système musculaire du myocarde. Ces deux tissus ont des propriétés électriques différentes, ce qui pourrait représenter une surface de ralentissement de la dépolarisation et constituer un substrat anatomique responsable du retard de la conduction. L'activation asynchrone du subendocarde et du subépicarde créerait un gradient de potentiel, responsable d'un courant électrotonique, entraînant une élévation du segment ST ainsi que des phénomènes de réentrée. Ce phénomène est amplifié par la perte de fonction du canal sodique $Na_v1.5$. En effet, un courant I_{Na} moins important diminue la vitesse de dépolarisation phase 0

du potentiel d'action, retarde la vitesse de dépolarisation du myocarde, et par voie de conséquence élargit le QRS (Figure 7A). Par ailleurs, le décalage de l'activation vers des potentiels plus positifs, souvent identifié lors de mutations du canal sodique cardiaque, augmente le seuil d'activation du potentiel d'action et retarde ainsi la dépolarisation myocardique (Figure 7B) [6]. Ce phénomène associé à une perte de courant I_{Na} est accentué lors du repos par l'augmentation de l'activité vagale et pourrait être la raison pour laquelle l'augmentation du segment ST serait plus importante au repos. Cette hypothèse est en accord avec le risque accru de syncope et de mort subite par fibrillation ventriculaire durant le sommeil chez des patients atteints du SBr (Figure 7C) [6].

A ce jour, ces deux hypothèses sont discutées, il s'avère que l'une n'exclut pas l'autre et que la combinaison d'un retard de conduction associé à un raccourcissement des potentiels d'action subépicardiques pourrait être à l'origine du syndrome de Brugada.

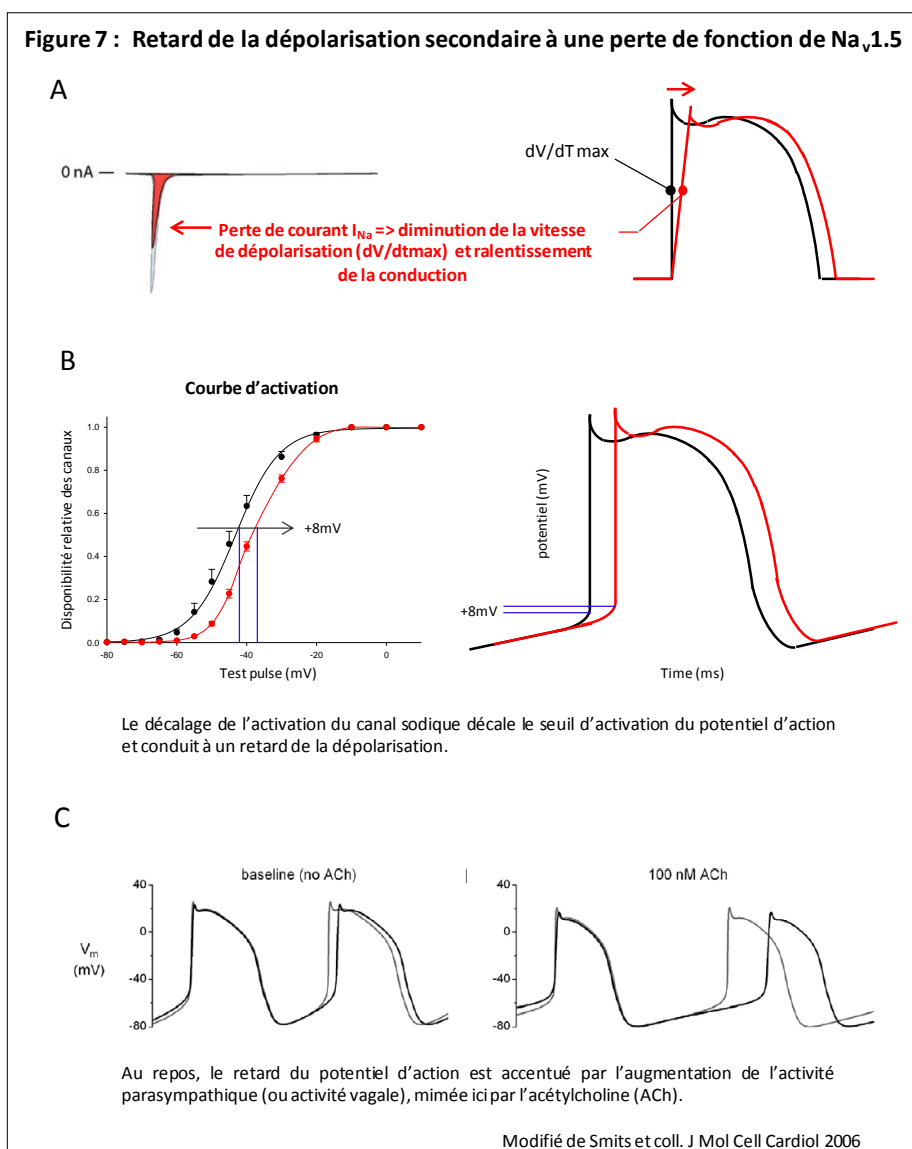
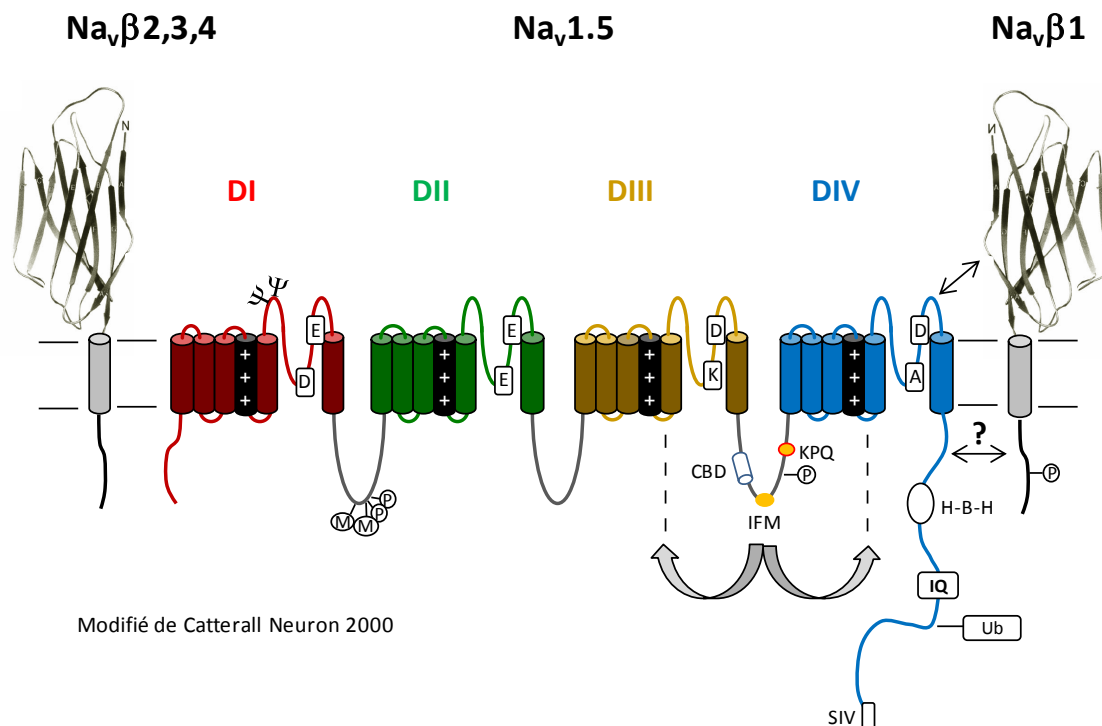


Figure 8 : Domaines fonctionnels du canal $\text{Na}_v1.5$ 

Modifié de Catterall Neuron 2000

Représentation schématique du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ et des sous-unités $\text{Na}_v\beta$. Les segments S4 chargés positivement, importants pour l'activation dépendante du potentiel, sont représentés en noir. La triade d'acides aminés IFM (●) joue le rôle de balle d'inactivation en se repliant sur les boucles intracellulaires liant les segments S4 et S5 des domaines DIII et DIV. Les acides aminés KPQ (●) jouent le rôle de « charnière » de la porte d'inactivation. Le site CBD (□) pour Calmoduline Binding Domain) situé dans la boucle liant les domaines DIII et DIV est capable de se lier au couple Ca^{2+} /calmoduline qui inhibe la formation de la porte d'inactivation. La structure hélice-boucle-hélice (H-B-H) (○) de la région C-terminale du canal (aa 1773 à 1921) et le domaine IQ (□) en aval prennent part à la formation de la porte d'inactivation à l'aide de la calmoduline. Une interaction de cette région avec la partie C-terminale de la sous-unité $\text{Na}_v\beta1$ est suspectée (↔). Néanmoins, cette dernière serait capable de se lier au canal par ses régions extracellulaires (↔). Les trois derniers acides aminés SIV (□) interagissent avec les domaines PDZ des protéines SAP97, syntrophine et PTPH1 qui jouent un rôle important dans l'adressage du canal au sarcolemme et dans la déphosphorylation du canal. Les sites connus de régulation post-traductionnelle sont notés des lettres : Ψ pour glycosylation, M pour méthylation, P pour phosphorylation, Ub pour ubiquitination. Enfin, le repliement tridimensionnel des 4 domaines permet la formation d'un entonnoir grâce aux boucles extracellulaires réentrant liant les segments S5 et S6 de chaque domaine. Les acides aminés (E375/E901/D1423/D1715) EEDD et (D373/E898/K1419/A1711) DEKA forment l'anneau extérieur et intérieur du pore. Ce dernier constitue le filtre sélectif aux ions sodium et la cible de la tétrodotoxine et saxitoxine (TTX et STX).

III. La sous-unité α du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$

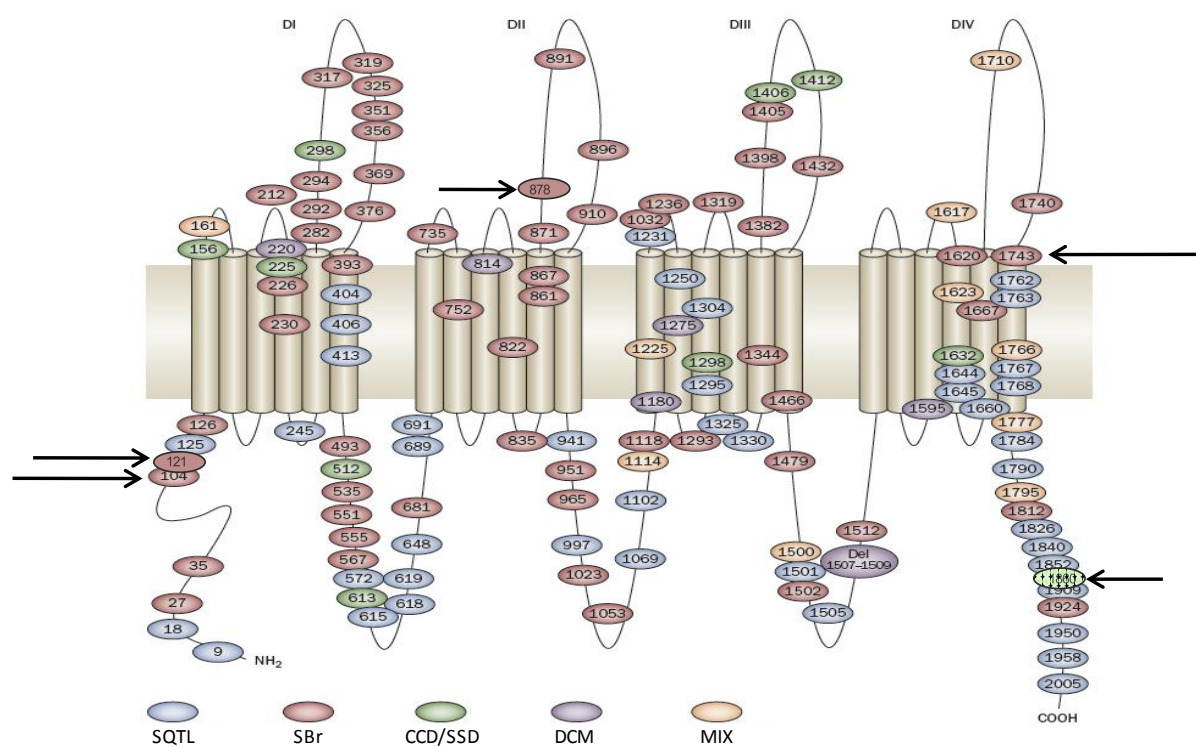
La sous-unité α du canal sodique cardiaque, $Na_v1.5$, est constituée de quatre domaines homologues (DI à DIV) de six segments transmembranaires chacun (S1 à S6) [33]. Les trois boucles reliant les domaines ainsi que les parties N- et C-terminales sont intracytoplasmiques (Figure 8) [34]. Ce canal fait partie de la famille des canaux sodiques dépendants du potentiel, $Na_v1.X$, qui comprend neuf canaux $Na_v1.1$ à $Na_v1.9$ possédant des propriétés biophysiques très proches. Ils sont majoritairement spécifiques d'un tissu, mais leur expression n'est pas exclusive, $Na_v1.5$ est par exemple majoritairement exprimé dans le cœur mais certaines isoformes sont aussi exprimées dans le cerveau [35]. Les canaux $Na_v1.X$ auraient évolué par mutations des canaux calciques Ca_v dépendants du potentiel qui sont aussi des canaux à quatre domaines transmembranaires [36]. A l'inverse, les gènes des canaux potassiques ne codent qu'un seul domaine. Ces derniers forment des tétramères de sous-unités le plus souvent identiques pour constituer un canal fonctionnel.

Le repliement des quatre domaines permet la formation d'un entonnoir sélectif des ions sodium, porté par le motif D/E/K/A. Chacun des 4 acides aminés de ce motif est apporté par un domaine différent (Figure 8). L'ouverture du canal est dépendante de la différence de potentiel entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Elle est possible grâce aux segments transmembranaires S4 chargés positivement (Figure 8). De plus, le canal sodique est capable de s'inactiver grâce à la porte d'inactivation formée de trois acides aminés hydrophobes « IFM » (isoleucine, phénylalanine, méthionine) située dans la boucle liant les domaines DIII et DIV (Figure 8). Enfin, sa fonction est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 8), sa liaison aux sous-unités β et à certains partenaires qui feront l'objet des chapitres suivant.

L'apparition de mutations dans le gène *SCN5A* a très souvent des conséquences biologiques importantes. En effet, de nombreuses mutations « perte de fonction » ont été répertoriées dans le gène *SCN5A* (Figure 9) [21]. Ces mutations peuvent altérer les propriétés cinétiques d'ouverture du canal, son expression et sa distribution à la membrane, ou encore sa dégradation [6, 37-39]. Ces mutations sont responsables d'arythmies cardiaques telles que le SBr, des troubles de la conduction (CCD pour cardiac conduction disease) dont la maladie de Lenègre. Cette dernière se manifeste par un bloc de branche droit ou gauche avec, à l'ECG, un élargissement du complexe QRS, puis par un bloc auriculo-ventriculaire, dû à un ralentissement important de la dépolarisation. Enfin ces mutations ont aussi été identifiées chez des patients atteints de fibrillations atriales (FA), ou de dysfonction du nœud sinusal (DNS) [39, 40]. Néanmoins, la raison de la fibrillation atriale due à une perte de courant sodique est moins bien comprise, mais pourrait être liée au raccourcissement de la

période réfractaire atriale et au ralentissement de la conduction qui sont considérés comme des substrats pour les réentrées responsables des arythmies [41]. Par ailleurs, plus de 80 mutations menant à un gain de fonction ont été identifiées. Ces dernières sont le plus souvent associées à un défaut d'inactivation [42, 43] et sont responsables du syndrome QT-long (SQTL), une maladie associée à un allongement de l'intervalle QT dû à une prolongation du potentiel d'action. Enfin, une perte ou un gain de fonction du canal $Na_v1.5$ peuvent conduire à des cas de mort subite infantile (MSI) [22, 23].

Figure 9 : Quelques mutations de $Na_v1.5$ impliquées dans les arythmies cardiaques



Représentation schématique du canal $Na_v1.5$ comprenant la localisation des mutations et leur phénotype associé. Abréviations : LQTS Syndrome du QT-long, BrS Brugada Syndrome, CCD maladie de la conduction cardiaque, SSD maladie du nœud sinusal, DCM cardiomyopathie dilatée, MIX phénotype mixte. Les flèches représentent les mutations qui ont été caractérisées dans notre étude.

Modifié de Ruan Y et coll Nat Rev Cardiol 2009

Dans ce chapitre, nous verrons que les canaux sodiques dépendants du potentiel sont à l'origine de l'apparition des cellules excitables et que leur évolution a contribué à la formation de systèmes complexes et organisés tels que le système nerveux, le système musculaire, ou même le système endocrinien des mammifères [36]. Ceci a été possible grâce à l'évolution des structures fondamentales de la protéine, qui sont des sites critiques pour l'apparition de mutations. Aussi, nous

aborderons l'organisation de ces structures ainsi que les modifications post-traductionnelles importantes dans la régulation du canal.

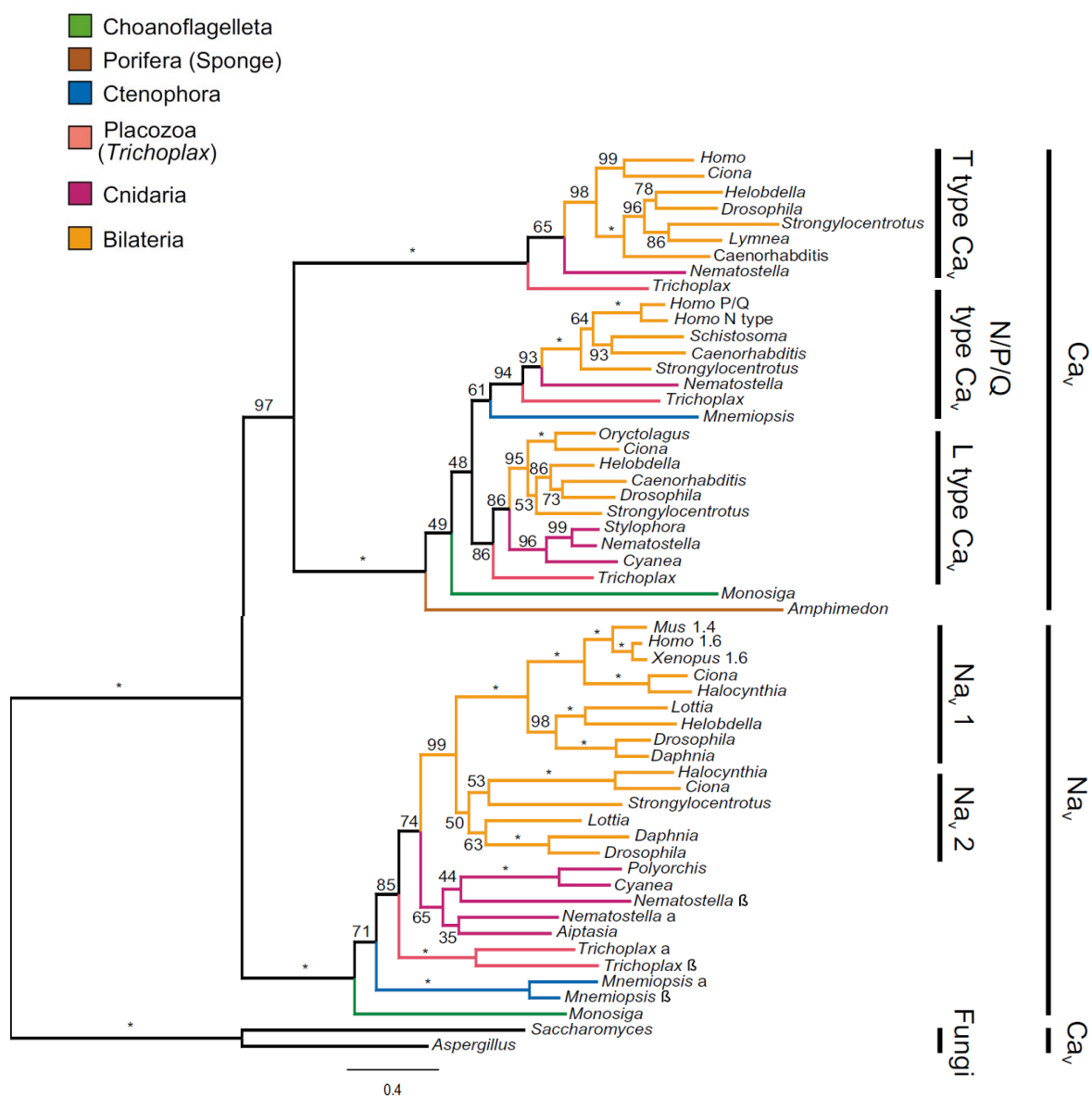
A/ Evolution des canaux sodiques dépendants du potentiel à l'origine des tissus excitables

Les canaux sodiques dépendants du potentiel (Na_v) furent les premiers de la superfamille des canaux ioniques à être découverts. Cette dernière inclut les canaux potassiques (K_v) et calciques (Ca_v) dépendants du potentiel, les canaux apparentés aux TRP (Transient Receptor Potential), une famille de canaux perméables à différents cations, ainsi que les canaux dépendants des nucléotides cycliques. Cependant, la famille des canaux sodiques dépendants du potentiel (Na_v) serait la plus récemment apparue au cours de l'évolution. Le canal « classique » à quatre domaines n'a pas été retrouvé chez les procaryotes. Néanmoins, un canal sodique dépendant du potentiel à un seul domaine mais formant des homo-tétramères a récemment été identifié dans la bactérie *Bacillus Halodurans*. Ce dernier possède des séquences et des caractéristiques pharmacologiques proches des canaux calciques dépendants du potentiel et est très certainement l'ancêtre des canaux Na_v et Ca_v connus chez les vertébrés [44, 45].

L'évolution du règne animal a pris un réel essor avec l'apparition du système nerveux, présent chez tous les animaux excepté chez les éponges et les métazoaires. La communication intercellulaire sur de longues distances à travers les cellules excitables est apparue chez les animaux bilatériens et quelques cnidaires (méduses) grâce aux potentiels d'action générés dans les neurones par les canaux sodiques dépendants du potentiel. Les canaux calciques dépendants du potentiel ont évolué dans les cellules eucaryotes unicellulaires où ils jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire.

Il est communément accepté que les canaux Na_v dérivent des canaux Ca_v , et que leur apparition est à l'origine du système nerveux [36]. Cette idée est renforcée par le manque apparent de courant sodique chez les éponges. Cette innovation aurait permis aux cellules de propager le potentiel d'action sans interférer avec la concentration de calcium intracellulaire utilisée dans la signalisation [46].

Figure 10 : Arbre phylogénique des canaux Na_v et Ca_v



Les scores de similarité sont notés sur les branches, les étoiles indiquent les scores de 100%. Les clades correspondant aux groupes majeurs de canaux ioniques sont détaillés à droite.

Modifié de Liebeskind et coll. Proc Natl Acad Sci U S A 2011

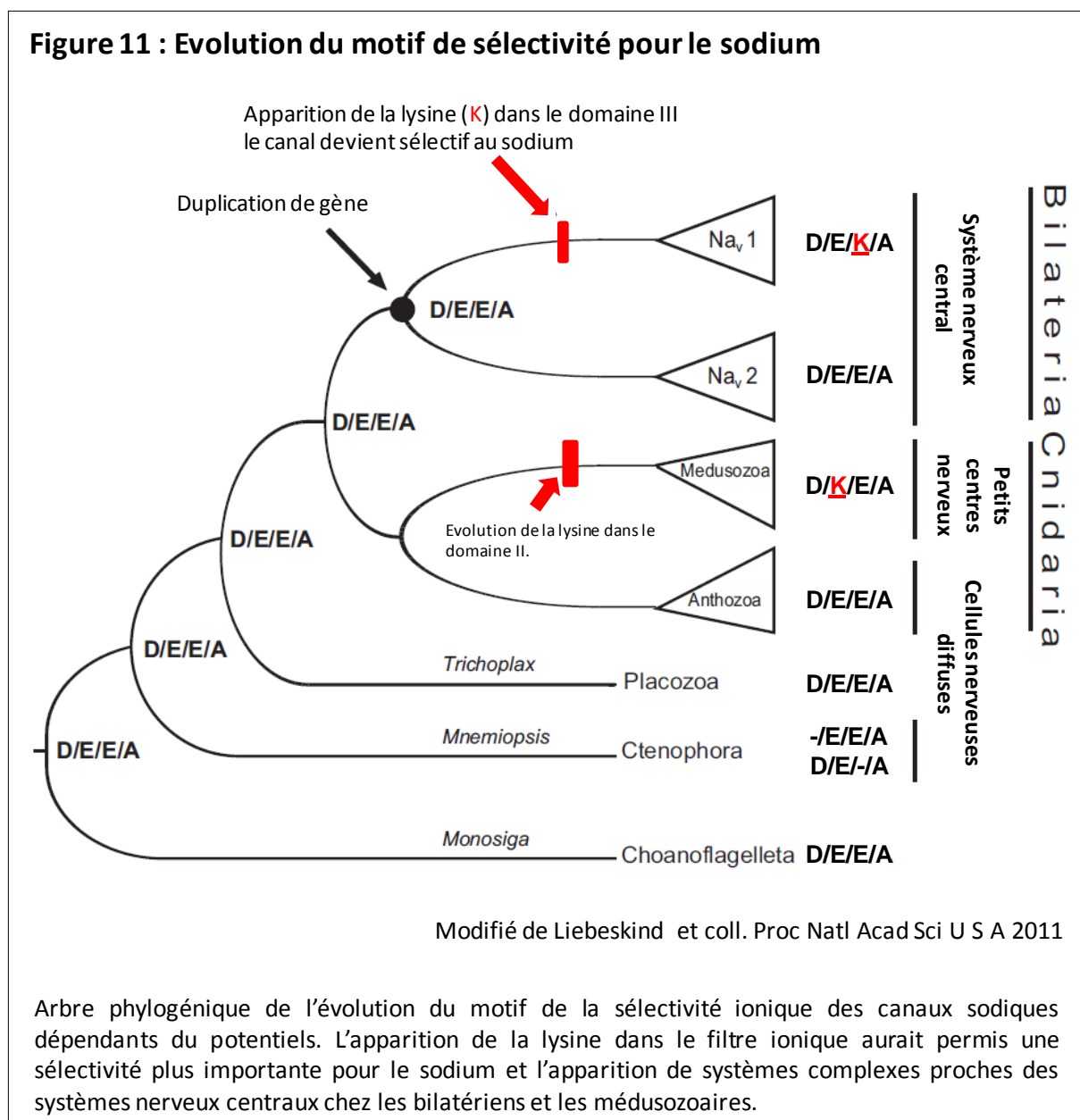
Cependant, tout récemment Liebeskind et coll. ont identifié chez une choanoflagellé (protiste unicellulaire), un gène codant pour un canal qui est homologue aux canaux sodiques mais ayant un site de sélectivité ionique intermédiaire entre celui des canaux calciques et des canaux sodiques [36]. Leurs recherches dans un large éventail de génomes d'animaux incluant les lignées les plus basales révèlent qu'un gène homologue existe dans la plupart de ces lignées (Figure 10). Par exemple, les placozoaires ne possèdent pas de système nerveux ; pourtant, une recherche d'ARNm montre que ces canaux sont bien exprimés. Des analyses phylogéniques regroupent ces canaux avec les canaux sodiques déjà connus (Figure 10). De cette phylogénie les auteurs en déduisent : d'une part, les motifs ancestraux du filtre ionique sélectif et d'autre part, que ce motif a été retenu dans les canaux des choanoflagellés et des placozoaires (Figure 11). Par ailleurs, ils ont aussi identifié les duplications de gènes clés et le remplacement d'acides aminés importants au cours de l'évolution animale (Figure 11).

Ces résultats récents semblent montrer que l'origine de la famille des canaux sodiques Na_v a précédé l'apparition du système nerveux, mais est aussi antérieur à l'apparition d'organismes pluricellulaires [36]. Cela supporte l'idée que les canaux Na_v dériveraient des canaux Ca_v par l'apparition de mutations *de novo*. Néanmoins, cela repousserait la date de divergence des canaux Na_v et Ca_v avant l'ancêtre commun entre les animaux (pluricellulaires) et les choanoflagellés (unicellulaire). Ainsi les systèmes complexes, comme les tissus excitables, auraient pu évoluer par assimilation de gènes déjà existants pour obtenir de nouvelles fonctions. En effet, c'est l'association des fonctions spécifiques des canaux Na_v et Ca_v qui aurait permis l'apparition d'un système complexe de tissus excitables [36].

A.1/ Evolution de la sélectivité du pore

L'évolution génétique des bilatériens permet de mieux comprendre l'évolution des canaux Na_v chez les mammifères. Le motif D/E/E/A formant l'anneau intérieur du pore, responsable de la sélectivité ionique, serait le motif ancestral des canaux Na_v (Figure 11). Il est intermédiaire entre celui des canaux Na_v (D/E/K/A) et celui des Ca_v (E/E/E/E) et pourrait être perméable aux deux espèces ioniques [47]. Les familles de gènes possédant le motif D/E/E/A ont été préservées chez les métazoaires. La topologie des clades de Na_v1 et Na_v2 supporte l'hypothèse selon laquelle la duplication des gènes serait survenue au moment du rayonnement des bilatériens et avant la séparation des protostomiens et deutérostomiens (Figures 10 et 11) [47]. Le clade Na_v1 évolua vers un pore au motif D/E/K/A, puis de multiples duplications chez les tétrapodes primordiaux ont permis l'apparition des gènes codant les canaux $Na_v1.1$ à $Na_v1.9$ des mammifères [48]. Le clade Na_v2 qui a

conservé l'ancien motif D/E/E/A, est présent chez un grand nombre d'organismes (Figure 10). Néanmoins, la raison de sa disparition chez les médusozoaires et les vertébrés, est encore inconnue. Très peu d'éléments sont connus sur ces canaux, mais des études de mutations du canal Na_v2 chez la drosophile montrent un effet sur le comportement olfactif. En revanche, aucune autre fonction n'a été suggérée chez d'autres organismes qui ne possèdent pas tous un système olfactif [49].



Au cours de l'évolution, les cnidaires (méduses) ont divergé avant la duplication, en conséquence ils ne possèdent pas le motif de sélection ionique D/E/K/A, mais D/E/E/A. Cette famille est composée de deux sous-familles : les médusozoaires et les anthozoaires (Figure 11). Une

substitution donnant le motif D/K/E/A chez les médusozoaires a joué un rôle primordial au cours de leur évolution (Figure 11). En effet, le motif D/K/E/A est moins sélectif pour le sodium que le motif D/E/K/A, mais plus que le motif D/E/E/A [50-53]. Ainsi, la préférence pour la lysine dans le motif de la sélectivité ionique est certainement le résultat d'une pression de sélection pour la sélectivité aux ions sodium qui permettrait d'éviter les perturbations de la concentration de calcium intracellulaire utilisé dans la signalisation chez les eucaryotes [36]. Aussi, certains médusozoaires possèdent des regroupements nerveux, ainsi que des organes complexes proches du système nerveux central chez les bilatériens. De telles structures organisées sont absentes chez les anthozoaires (Figure 11). Ces résultats suggèrent que l'apparition d'un canal sélectif aux ions sodium de type $Na_v1.X$ aurait permis l'apparition et l'évolution de systèmes nerveux et musculaires de plus en plus complexes.

A.2/ Evolution de l'inactivation rapide

Les acides aminés hydrophobes de la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV sont des sites critiques pour l'inactivation des canaux [54]. Ils sont conservés dans tous les canaux sodiques Na_v1 et Na_v2 (Figure 12A) [36]. Leur structure secondaire est aussi relativement bien conservée. Deux hélices α de chaque côté de la triade d'acides aminés hydrophobes (IFM pour $Na_v1.5$) formant la « particule d'inactivation » pourraient agir comme stabilisateur de l'inactivation lorsque le canal se referme (Figure 12B) [34, 55]. Ces deux hélices α sont présentes dans la famille des Na_v mais absentes dans celle des Ca_v . Cette récente découverte suggère que les canaux sodiques possèderaient tous une porte d'inactivation même dans les lignées les plus basales telles que les choanoflagellés (Figure 12A) [36].

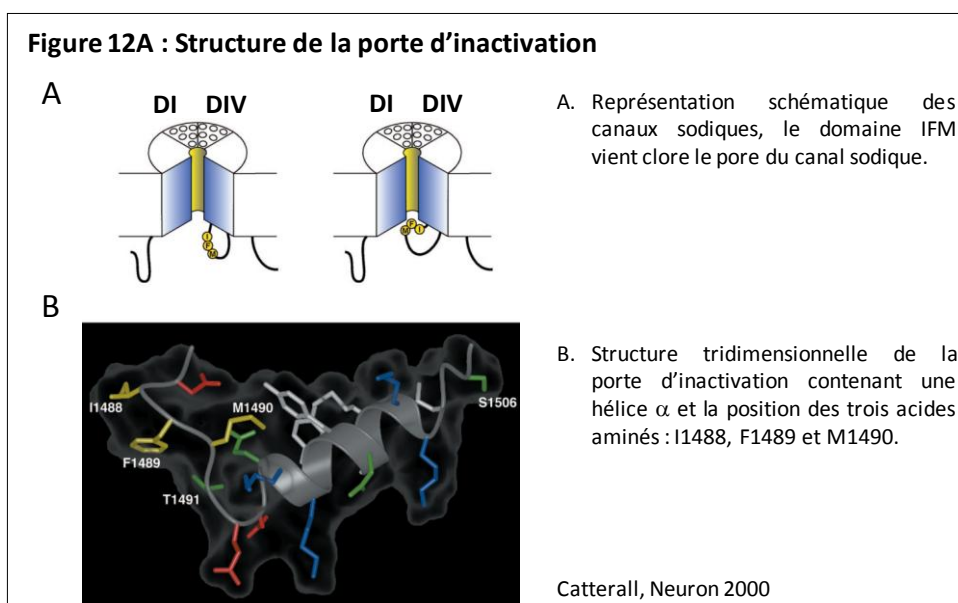
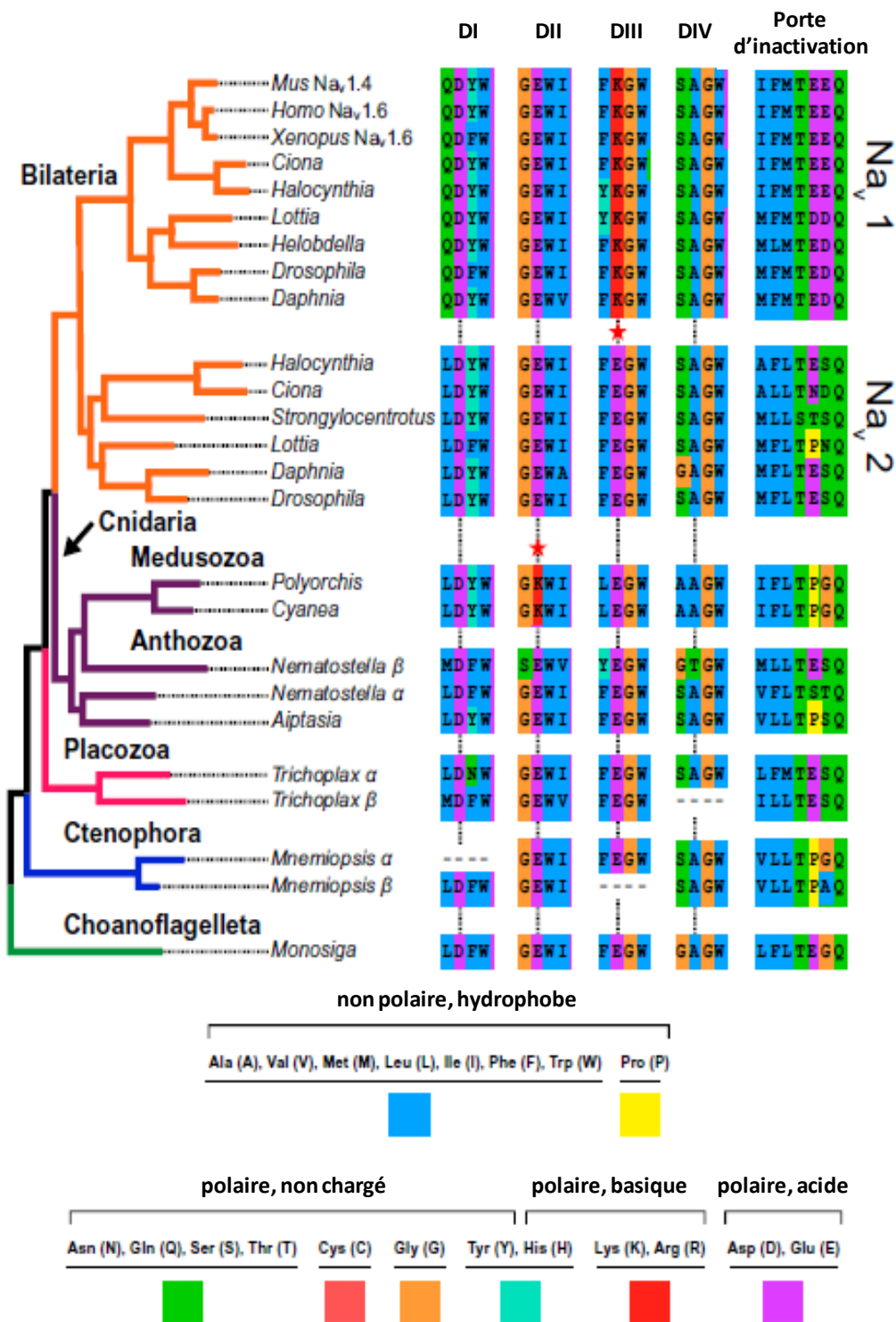


Figure 12B : Une porte d'inactivation très conservée au cours de l'évolution



Phylogénie des canaux Na_v. Les taxons possèdent les mêmes couleurs que sur la figure 10. Les alignements des acides aminés importants des boucles du pore des quatre domaines (DI-DIV), ainsi que la particule d'inactivation dans la porte d'inactivation correspondant à chaque taxon sont représentés. Les acides aminés critiques dans le pore sont indiqués par des lignes verticales. Il est intéressant de noter la conservation fonctionnelle du triplet hydrophobe appelé la « particule d'inactivation » (les trois premiers acides aminés dans la porte d'inactivation).

Modifié de Liebeskind et coll. Proc Natl Acad Sci U S A 2011

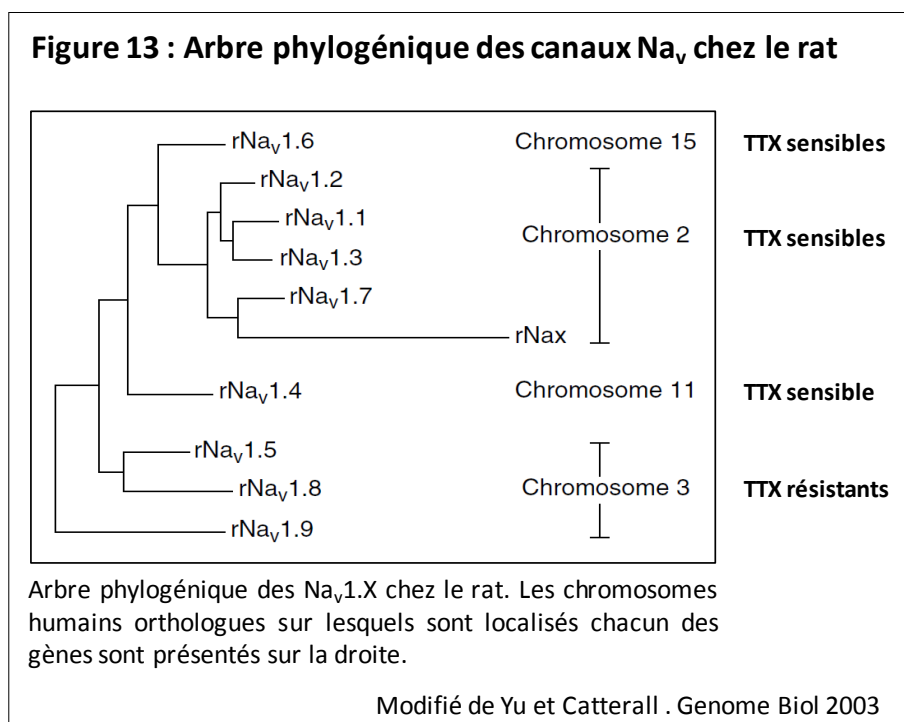
Ces résultats s'ajoutent à l'évidence grandissante que la plupart du répertoire génétique pour le développement animal, la signalisation cellulaire, et même le système nerveux étaient déjà présents chez l'ancêtre commun des choanoflagellés (unicellulaire) et des animaux pluricellulaires. Les choanoflagellés possèdent des gènes de l'adhésion cellulaire, des tyrosines kinases, des protéines apparentées à celle de la densité post-synaptique des neurones (zone de la synapse riche en protéines où sont concentrés les récepteurs de neurotransmetteurs) et un nombre remarquable de protéines impliquées dans la signalisation du calcium [36]. La fonction des canaux sodiques chez ces animaux reste encore inconnue, mais elle pourrait servir à réguler le taux de sodium intracellulaire chez certains de ces animaux marins et jouer un rôle dans la motricité [36]. Ainsi, déterminer la sélectivité des ions de ces canaux s'avère nécessaire pour comprendre l'évolution de la sélectivité au calcium vers la sélectivité au sodium, qui semble être la résultante de mutations séquentielles. La compréhension de la fonction de ces canaux pourra non seulement permettre de comprendre l'histoire des protéines nécessaires à l'adaptation de la mobilité, mais aussi celle de l'évolution du système nerveux et des cellules excitables [36]. Cette adaptation est la raison pour laquelle les gènes des canaux sodiques dépendants du potentiel ont été identifiés chez beaucoup d'animaux : les mouches, les sangsues, les sèches, les méduses, tout comme chez les vertébrés, mammifères ou non [56, 57]. Aussi, elle permet de comprendre pourquoi les propriétés biophysiques, pharmacologiques, l'organisation des gènes et même les sites d'épissage des introns des canaux sodiques chez les invertébrés sont très similaires à ceux des mammifères [58].

De ces études nous retiendrons : (1) l'évolution vers un pore de plus en plus sélectif pour les ions sodium a permis l'évolution vers des cellules excitables permettant l'apparition de la mobilité et d'un système nerveux central de plus en plus évolué. (2) La conservation de certaines structures durant des millions d'années d'évolution qui souligne l'importance fondamentale de la conformation nécessaire à leur bon fonctionnement. Aussi, l'étude de l'évolution de ces systèmes plus primitifs pourrait permettre de mieux comprendre les systèmes complexes des cellules excitables chez les mammifères [36].

A.3/ La famille des canaux sodiques $Na_v1.X$ chez les mammifères

Neuf sous-unités α dépendantes du potentiel ont été caractérisées ($Na_v1.1$ à $Na_v1.9$). Une dixième (Na_x) a été rapportée et pourrait aussi fonctionner comme un canal sodique [57], [59]. Les acides aminés de ces canaux sont conservés à plus de 50% dans les segments transmembranaires et boucles extracellulaires. Au moins 20 exons codent chacun des neuf canaux sodiques. Leurs gènes sont classés en quatre groupes selon leur évolution, et les membres de chaque groupe sont localisés

sur un même segment de chromosome (Figure 13). Les segments chromosomiques contenant les gènes des canaux sodiques sont paralogues (issus de duplications) et chacun contient de plus un groupe de gènes Hox (**H**omeo**b**ox) codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement [58]. Ces facteurs de transcription interviennent dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur tel que le tube neural et sont responsables de l'identité cellulaire durant le développement [60]. Par ailleurs, on notera que les gènes des canaux sodiques et les gènes Hox, sont réexprimés de façon pathologique dans des cellules cancéreuses capables de métastaser et sont impliqués dans la mobilité cellulaire [60-62].



Chaque canal sodique possède un rôle physiologique spécifique chez les mammifères, ainsi l'expression de canaux est le plus souvent spécifique d'un tissu (Tableau 2)[62]. Chez l'Homme, les gènes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN9A*, codant pour les canaux Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 et Na_v1.7 sont localisés sur le chromosome 2. Ces canaux partagent certaines similitudes telles que des homologies de séquence, des caractéristiques biophysiques, la capacité d'être bloqués par des concentrations de l'ordre du nanomolaire par la neurotoxine tétrodotoxine (TTX) qui se fixe sur le motif de sélectivité (D/E/K/A) et sont majoritairement exprimés dans les neurones [63]. Un second groupe de gènes, *SCN5A*, *SCN10A*, *SCN11A*, codant des canaux sodiques Na_v1.5, Na_v1.8 et Na_v1.9 sont localisés sur le chromosome 3, en 3p21-24 [63]. Leur séquence est similaire à 75% aux canaux Na_v du chromosome 2, néanmoins le changement de quelques acides aminés leur confère un degré variable de résistance

à la TTX. Dans le cas du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$, la seule substitution de la cystéine 373 en phénylalanine (C373F) réduit de deux cent fois sa capacité à résister à la TTX et le canal devient alors aussi sensible que les canaux sodiques codés par le chromosome 2 [64]. Pour les canaux sodiques $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$, le résidu à la même position est une sérine, ce qui leur confère une plus grande résistance à la toxine [65]. Ces derniers sont préférentiellement exprimés dans les neurones sensitifs périphériques [66, 67].

Les deux dernières isoformes, $Na_v1.4$ exprimée dans les muscles squelettiques et $Na_v1.6$ fortement exprimée dans le système nerveux central, ont une identité de séquence de plus de 85% et des propriétés fonctionnelles similaires à celles des canaux codés par le chromosome 2, incluant une grande sensibilité à la TTX. Le gène *SCN4A* codant $Na_v1.4$ est situé sur le chromosome 11 et le gène *SCN8A* codant $Na_v1.6$ sur le chromosome 15 [57, 63] (Figure 13).

Tableau 2 : Les canaux sodiques humains

A/ Les sous-unités α		
Protéine	Gène	Expression tissulaire
$Na_v1.1$	SCN1A	SNC, SNP, cœur
$Na_v1.2$	SCN2A	SNC, SNP
$Na_v1.3$	SCN3A	SNC, SNP
$Na_v1.4$	SCN4A	Muscle squelettique
$Na_v1.5$	SCN5A	Cœur, muscle squelettique non innervé, cerveau
$Na_v1.6$	SCN8A	SNC, SNP, cœur
$Na_v1.7$	SCN9A	SNP, cellules neuroendocrines, neurones sensoriels
$Na_v1.8$	SCN10A	Neurones sensoriels
$Na_v1.9$	SCN11A	Neurones sensoriels
Na_x	SCN6A (ou SCN7A)	Cœur, utérus, muscle squelettique, astrocytes, ganglions dorsaux
B/ Les sous-unités $Na_v\beta$		
Protéine	Gène	Expression tissulaire
$Na_v\beta1$	SCN1B	Cœur, muscle squelettique, SNC, cellules gliales, SNP
$Na_v\beta1B$	SCN1B	Cœur, muscle squelettique, SNP, glandes surrénales
$Na_v\beta2$	SCN2B	SNC, SNP, cœur, cellules gliales
$Na_v\beta3$	SCN3B	SNC, muscle squelettique, rein, SNP
$Na_v\beta4$	SCN4B	Cœur, muscle squelettique, SNC, SNP

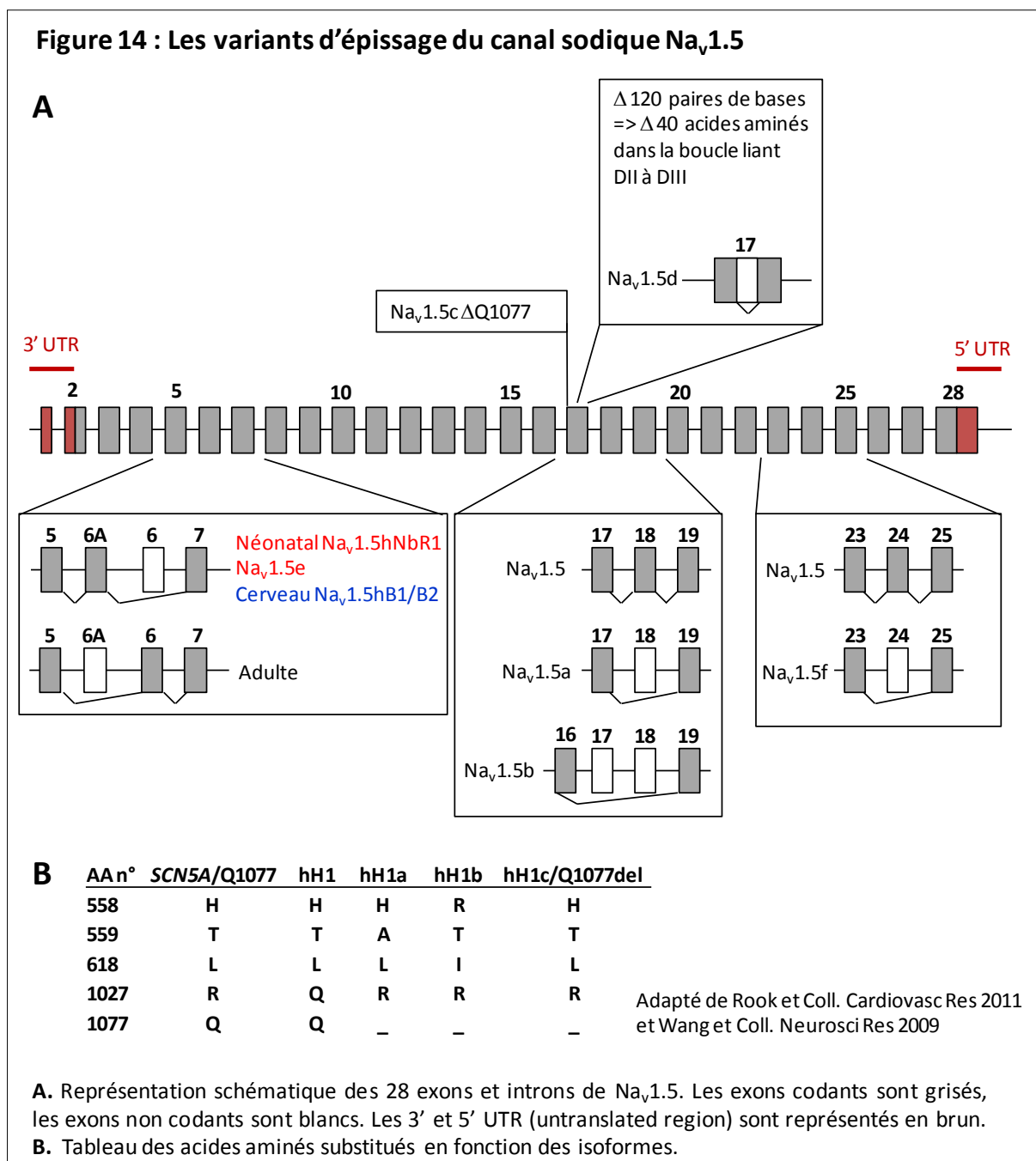
Abréviations : SNP = système nerveux périphérique, SNC = système nerveux central

Modifié de Brackenbury WJ, Mustafa BA, Neuroscientist 2008

Le locus du gène *SCN6A* (ou *SCN7A*) codant le dixième canal sodique, Na_x , est proche des autres canaux sodiques du chromosome 2 (Figure 13). Néanmoins, il est plus divergent en séquence. Il aurait évolué différemment des canaux sodiques dépendants du potentiel [57]. En effet, des différences fonctionnelles importantes ont été notées dans le segment sensible au potentiel et dans la porte d'inactivation du canal. L'impossibilité de détecter une fonction physiologique dans un

système d'expression hétérologue suggère que ce canal ne fonctionne pas comme les autres canaux sodiques dépendants du potentiel. De plus, les souris issues de l'inactivation génique de Na_x (Na_x^- déficient mice) ont un déficit de sensibilité aux variations de concentration de sels extracellulaires dans l'hypothalamus, indiquant que ce canal pourrait agir comme un canal sensible au sel, plutôt qu'un canal activé par le potentiel [59].

Figure 14 : Les variants d'épissage du canal sodique $Na_v1.5$



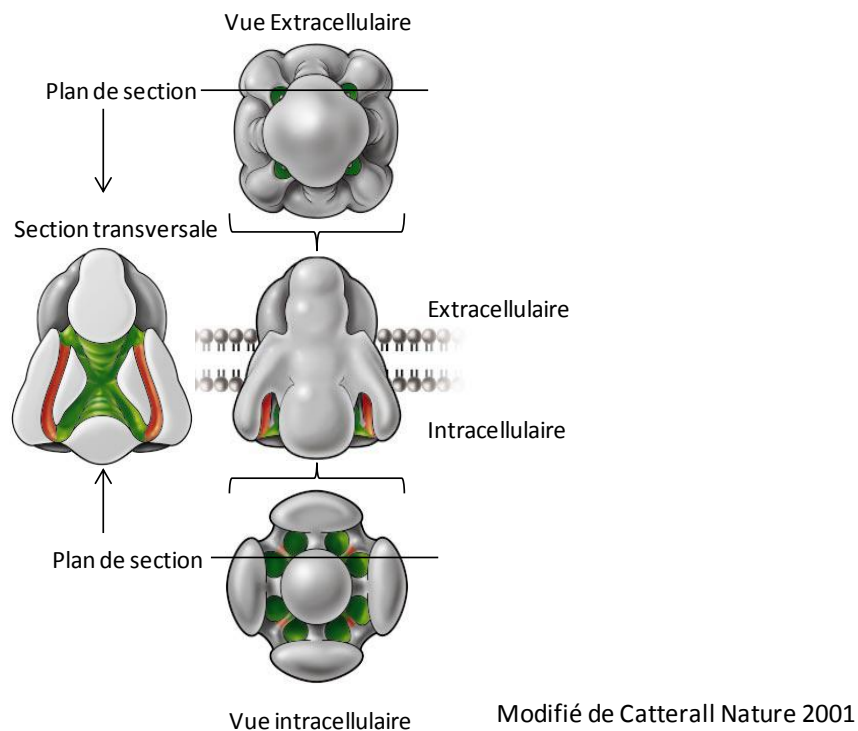
B/ Le canal sodique cardiaque dépendant du potentiel, Na_v1.5

B.1/ Les isoformes du canal sodique Na_v1.5

Le gène *SCN5A* est constitué de 28 exons : les exons 2 à 28 codent la protéine, l'exon 1 et une partie de l'exon 2 codent selon l'épissage pour différentes séquences non traduites en 3' (ou 3'UTR), et la fin de l'exon 28 pour différentes séquences de régions non traduites en 5' ou (5'UTR pour untranslated region) [68]. Les isoformes cardiaques, Na_v1.5, Na_v1.5a, Na_v1.5b, Na_v1.5c, Na_v1.5d sont issus de différentes variations d'épissage (Figure 14). En plus de ces cinq isoformes, il existe des isoformes néonatales, Na_v1.5hNbR1 et Na_v1.5hNbR1-2, issues d'un épissage alternatif de l'exon 6 en exon 6A. L'exon 6A code pour le même nombre d'acides aminés que l'exon 6 mais possède 7 substitutions situées dans le segment S3, la boucle liant le segment S3 et S4 et le segment S4 du domaine DI (Figure 14A) [35, 68]. Les caractéristiques biophysiques de l'isoforme Na_v1.5hNbR1 ont été étudiées par Onkal et coll. et présentent un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels dépolarisés et de la courbe d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés. Par ailleurs, la cinétique d'inactivation est altérée et le retour à l'état activable plus rapide [61]. Ces isoformes néonatales sont aussi exprimées dans certaines cellules cancéreuses capables de métastaser comme la lignée cellulaire humaine de neuroblastome NB-1 et la lignée cellulaire humaine de cancer du poumon MDA-MB 231. La présence du canal dans ces cellules pourrait être associée à leur comportement invasif [61, 62]. Récemment, Wang et coll. ont montré la présence de deux nouvelles isoformes dans le cerveau adulte, toutes deux issues de l'épissage alternatif de l'exon 6 : Na_v1.5hB1 et Na_v1.5hB2 (Figure 14A). De plus, Na_v1.5hB1 posséderait 20 substitutions d'acides aminés réparties dans diverses régions du canal comparée à l'isoforme néonatale Na_v1.5hNbR1. Néanmoins, l'origine de ces substitutions n'est pas encore connue [35]. Quant à l'isoforme Na_v1.5hB2, elle ne possède pas l'exon 24, en conséquence elle perd 18 acides aminés de la boucle du segment S5/S6 du domaine DIII qui sont nécessaires à la formation du filtre sélectif du canal, aussi la fonctionnalité de cette dernière isoforme reste à déterminer [35].

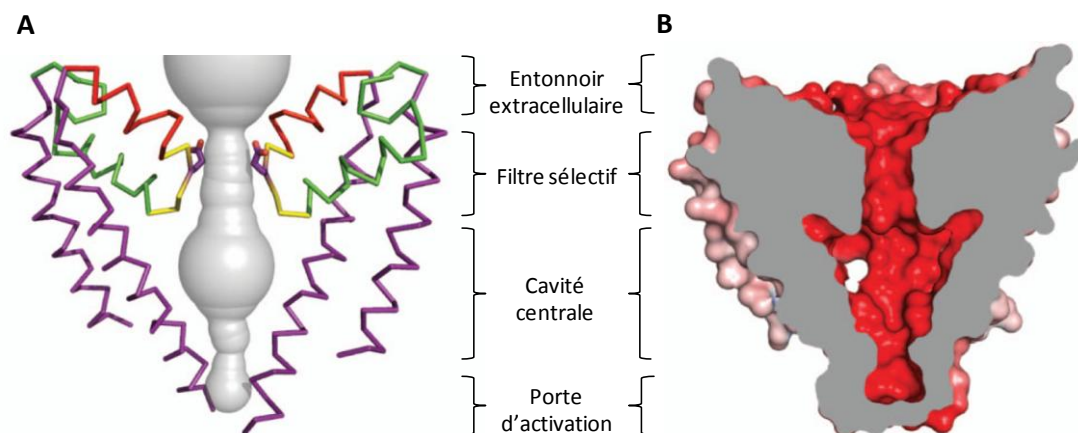
Il est intéressant de noter que le polymorphisme H558R est connu pour avoir la capacité de restaurer partiellement le courant sodique altéré par certaines mutations, même si le polymorphisme est situé le second allèle. Récemment, Shinlapawittayatorn et coll. ont montré qu'un polypeptide encadrant la région du polymorphisme possédait cette capacité. Aussi ces auteurs suggèrent que le polypeptide pourrait faciliter le repliement de la protéine mutante et permettra ainsi son transport vers la membrane [69-72]. Ces derniers résultats suggèrent que les canaux Na_v1.5 pourraient interagir dès le Réticulum Endoplasmique.

Figure 15 : Structure tridimensionnelle des canaux $\text{Na}_v1.X$ résolue par microscopie cryoélectronique



Structure tridimensionnelle des canaux $\text{Na}_v1.X$ résolue par microscopie cryoélectronique basée sur les images de Sato et coll. 2001. En vert est indiqué le pore central qui conduit les ions et ses connexions intra- et extracellulaires. En rouge sont indiqués les pores périphériques latéraux contenant les segments S4 et qui pourraient permettre leur mouvement lors de la dépolarisation. Les droites noires montrent la position à laquelle la section transversale a été réalisée.

Figure 16 : Structure du pore du canal sodique bactérien Na_vAb



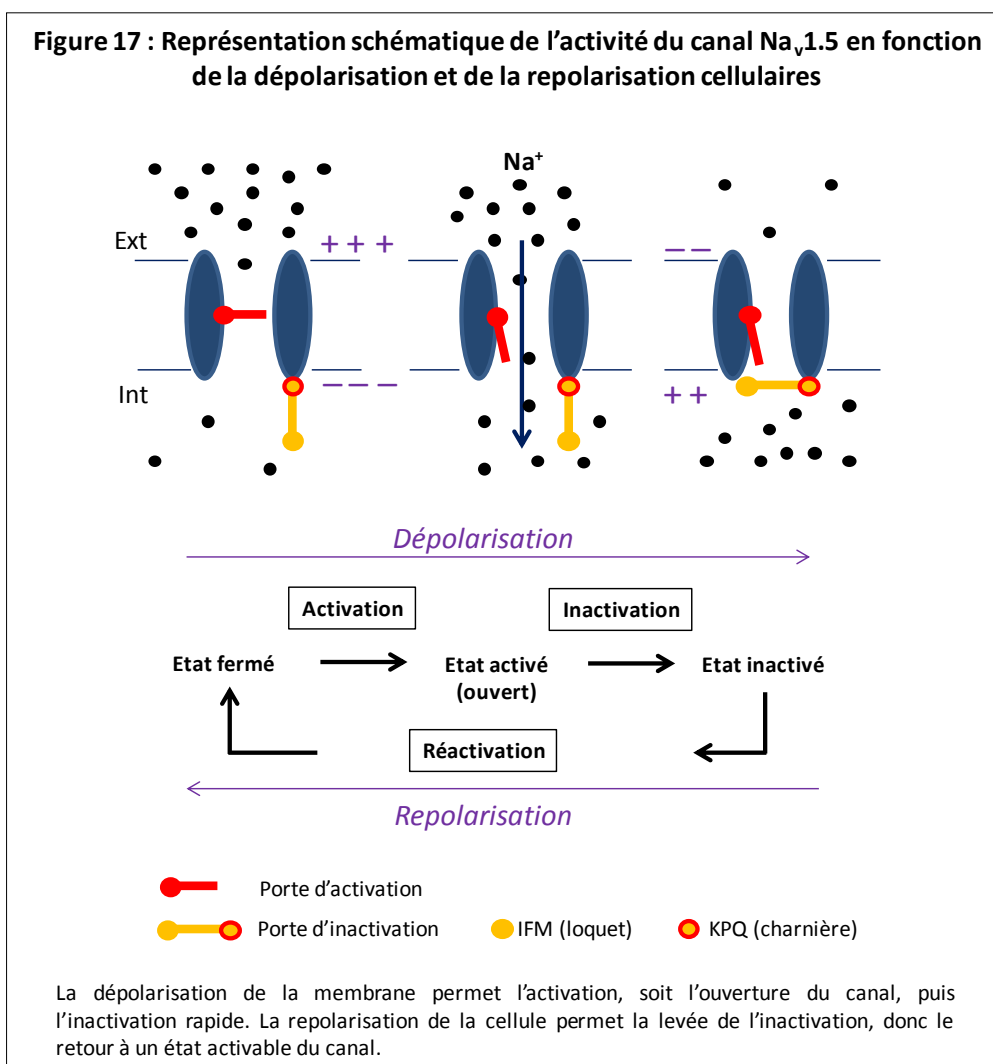
A. Architecture du canal Na_vAb : les acides glutamiques sont en violet et le volume du pore est représenté en grisé. **B.** Potentiel électrostatique de -10 à 10kT (du rouge au gris).

Modifié de Payandeh et coll. Nature 2011

B.2/ Structure du canal sodique Na_v1.5

Le canal sodique cardiaque Na_v1.5 est une protéine glycosylée de 227kD comprenant 2016 acides aminés pour la plus longue des isoformes. D'après Sato et coll., le canal sodique aurait une forme générale en cloche possédant deux masses intra et extracellulaires permettant le passage de milieu aqueux (Figure 15) [73]. Cette représentation du canal réalisée par microscopie cryoélectronique présente un pore central qui ne relie pas directement le milieu extracellulaire au milieu intracellulaire, mais se sépare en quatre branches suggérant qu'il y aurait quatre pores transmembranaires périphériques latéraux aux fonctions encore inconnues, qui pourraient permettre le mouvement des segments S4 sensibles au potentiel (Figure 15) [73, 74]. Une structure tridimensionnelle du canal entier n'a pas encore été réalisée, cependant la découverte du canal sodique bactérien NaChBac d'un seul domaine de six segments transmembranaires a fourni un nouvel outil plus simple pour des expériences de mutagenèse permettant de mieux comprendre le lien entre la structure et la fonction du canal sodique [44]. Son filtre sélectif au sodium est symétrique, formé par un résidu glutamate (E) dans les quatre boucles formant le pore et ressemble à celui du canal calcique [75]. La forme globale de la région du pore du canal sodique est décrite comme étant similaire à celle des canaux potassiques résolue par cristallographie [75]. Les boucles extracellulaires entre les segments S5 et S6 seraient disposées de façon symétrique, et la lumière du pore serait principalement délimitée par les segments S6 et les parties réentrantantes de la boucle qui forment le filtre ionique sélectif (Figure 8).

Cette structure a été confirmée par Payandeh et Coll. qui ont cristallisé un autre canal sodique bactérien, Na_vAb de la bactérie *Arcobacter butzleri*, dont la structure du pore est représentée sur la Figure 16. Par ailleurs, cette étude a permis de mieux comprendre le réseau d'interactions entre acides aminés tels que les arginines du segment S4 permettant de stabiliser et de catalyser le mouvement des charges durant l'activation, l'importance du mouvement des autres segments transmembranaires et de la partie N-terminale de ce canal, la sélectivité aux ions, ou encore l'accessibilité de certaines familles de drogues à leur site d'interaction [45].



Lors de la dépolarisation et de la repolarisation de la membrane, les canaux sodiques transitent entre trois états conformationnels : ouvert, inactivé et fermé (Figure 17) [76, 77]. La dépolarisation des myocytes à partir du potentiel de repos entraîne l'activation, c'est-à-dire l'ouverture des canaux sodiques. Lorsque la dépolarisation est maintenue, les canaux s'inactivent rapidement et entrent dans un état non-conducteur. Dans cet état inactivé, les canaux sont incapables de se rouvrir et doivent passer par une phase de réactivation pour recouvrer leur état fermé activable à partir duquel ils s'activeront lors de la prochaine dépolarisation (Figure 17). Néanmoins, l'activation et l'inactivation du canal sodique ne sont pas deux phénomènes complètement indépendants. Le canal sodique change de conformation grâce à des structures qui sont très conservées au sein des canaux $\text{Na}_v1.X$ et qui sont à l'origine des trois clés fonctionnelles des canaux sodiques, comme définies par Hodgkin et Huxley en 1952 : (1) une sélectivité ionique, (2) une activation dépendante du potentiel, et (3) une inactivation rapide.

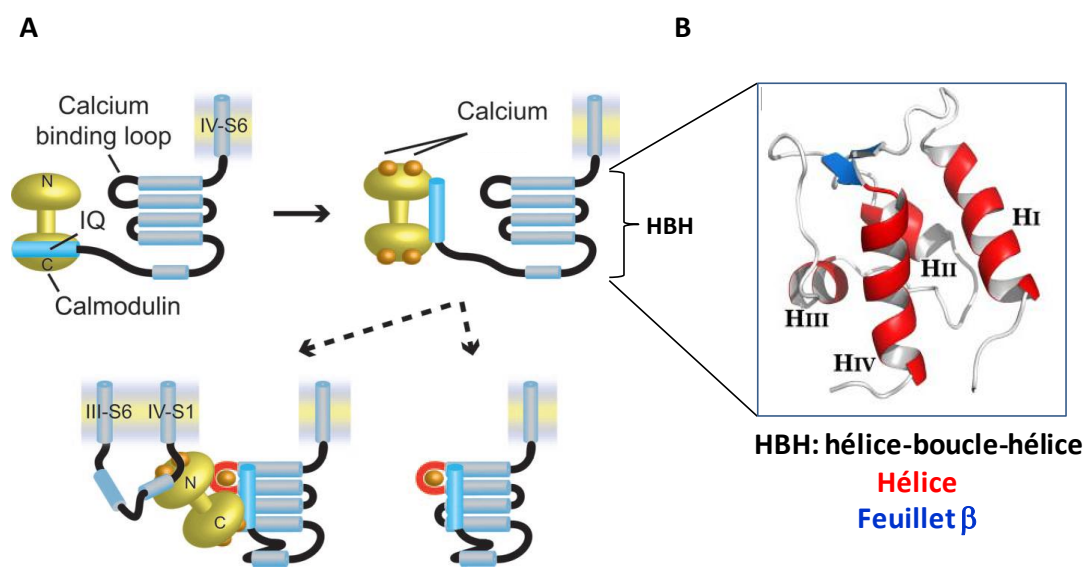
1-La sélectivité aux ions sodium : Les neurotoxines telles que la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine (STX), qui sont capables de bloquer l'ouverture du pore, ont été exploitées pour révéler les acides aminés impliqués dans la formation du pore extérieur et la sélectivité du filtre ionique. Le pore est formé par les boucles réentrantes entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. Deux acides aminés chargés négativement en position analogue dans chacune des 4 boucles sont particulièrement importants pour la sélectivité du filtre ionique. Ils forment 2 anneaux dans le pore, l'un interne (D/E/K/A) et l'autre externe (E/E/D/D) (Figure 8). Ce sont des sites de fixation pour les bloqueurs du pore, comme la TTX et la STX (figure 8). Des mutations de ces résidus empêchent la liaison de la TTX et de la STX et modifient la perméabilité au sodium du canal [78]. En effet, Heinemann et coll. ont produit un canal sodique sélectif des ions Ca^{2+} en mutant les acides aminés (D/E/K/A) de l'anneau intérieur en (E/E/E/E), leurs homologues dans le canal calcique [51]. Il est intéressant de noter que le résidu cystéine en position 373, en amont de l'acide aspartique (372D) qui forme l'anneau intérieur du pore dans la boucle liant les segments S5-S6 du domaine I confère au canal sodique cardiaque une résistance spécifique au blocage par la TTX. Les autres isoformes neuronales et musculaires ne possèdent pas cette cystéine [79].

2-L'Activation dépendante du potentiel : Les segments transmembranaires S4 sont composés de motifs répétés formés d'un résidu positif suivi de deux résidus hydrophobes, le tout constituant une hélice α chargée positivement. Le segment S4 du domaine IV servirait de senseur des variations de potentiel non seulement pour l'activation mais aussi pour l'inactivation du canal [80]. Les segments S4 des trois autres domaines contribuent également aux deux processus mais à différents degrés [81, 82]. Pendant la dépolarisation, le mouvement des segments S4 vers l'extérieur et leur rotation simultanée permet des changements conformationnels et l'ouverture du canal sodique. Ce modèle d'hélices « glissantes » (Sliding helix) ou « vissantes » (helical screw) a été très étudié [34, 76, 83]. Par exemple, la substitution des acides aminés positifs du segment S4 par des acides aminés non chargés réduit de façon significative la dépendance au potentiel du canal [80]. Le mouvement vers l'extérieur du segment S4 a été mis en évidence grâce à une stratégie de substitution de certains acides aminés de l'hélice par des cystéines. Les cystéines rendues accessibles lors de l'activation par le mouvement vers l'extérieur du segment S4 pouvaient alors interagir avec des réactifs sulfhydryles et former des ponts disulfures [84-86].

3-L'Inactivation : L'inactivation du canal sodique s'opère en quelques millisecondes après son ouverture. Elle est caractérisée par deux composantes cinétiques, l'une rapide l'autre lente (fast and slow inactivation). Dans le modèle le plus accepté, la boucle intracellulaire très conservée reliant le domaine III et IV sert de porte d'inactivation rapide, tel un couvercle à charnière. Le loquet de la

porte serait la triade IFM formée par l'isoleucine 1488, la phénylalanine 1489 et la méthionine 1490, trois acides aminés hydrophobes. Elle jouerait le rôle de balle d'inactivation capable de se lier à la partie intracellulaire du pore, permettant ainsi son inactivation [80, 87, 88]. Trois autres acides aminés constituant le motif KPQ formé de la lysine 1505, la proline 1506 et la glutamine 1507, situés dans la partie plus distale de la boucle jouerait le rôle de « charnière » permettant le repliement de la boucle (Figure 8). Des perfusions intracellulaires de protéases [89] ou d'anticorps spécifiques de cette boucle [90] empêchent l'inactivation rapide. Des peptides contenant le motif IFM sont capables de restaurer l'inactivation de canaux sodiques ayant une porte d'inactivation mutée [91]. Des mutations de la phénylalanine 1489 en d'autres acides aminés inhibent l'inactivation de façon variable. Il est intéressant de noter que l'inactivation du canal sodique bactérien NaChBac est cent fois plus lente que celle des canaux sodiques $\text{Na}_v1.X$ du fait de l'absence d'équivalent de la porte d'inactivation [75].

Figure 18 : Structure tridimensionnelle hélice-boucle-hélice de la partie C-ter de $\text{Na}_v1.5$



Modifié de Shah et coll. Proc Natl Acad Sci U S A 2006
 et de Chagot et coll. J Biol Chem 2009

- A. Les hélices α sont représentées par les cylindres bleus, le motif IQ en bleu ciel, la calmoduline en jaune et le calcium en rouge. Privée de calcium, la calmoduline se lie au domaine IQ. Lorsque la concentration de calcium augmente, ce dernier se fixe sur la calmoduline qui perd partiellement son affinité pour le domaine IQ. Elle se lierait alors plus facilement au domaine CBD (Calmodulin Binding Domain) situé dans la boucle liant les domaines III et IV. Ceci permet le repliement du motif IQ vers la structure en hélice-boucle-hélice, HBH, capable de lier le calcium. La calmoduline permettrait le rapprochement de la structure HBH et de la porte d'inactivation, néanmoins sa présence inhiberait la formation complète de la porte d'inactivation.
- B. Représentation de la structure tridimensionnelle de la région C-terminale en hélice-boucle-hélice, HBH.

L'analyse de cette boucle par résonance magnétique nucléaire (RMN), prédit une structure rigide en hélice α , précédée de deux tours positionnant ainsi le motif IFM de telle manière qu'il puisse interagir et bloquer la partie interne du pore (Figure 12B) [92]. Le site récepteur de la porte d'inactivation est moins bien connu. Il semble être composé de multiples acides aminés hydrophobes localisés dans la partie interne du pore. Des expériences de mutagénèse dirigée d'acides aminés hydrophobes dans les boucles intracellulaires entre S4 et S5 des domaines III et IV, ou les parties intracellulaires des segments S6 de ces domaines montrent que ce sont les éléments récepteurs de la porte d'inactivation (Figure 8) [93-95]. Des études ont montré que d'autres domaines du canal comme le segment transmembranaire S6 du domaine IV [96] ou la partie C-terminale proximale qui possède des motifs en hélice-boucle-hélice (HBH) sont également impliqués dans l'inactivation du canal sodique.

La partie C-terminale intracytoplasmique est constituée de 244 AA, sa région proximale (de 1773 à 1921) est structurée en six hélices α [97], alors que la conformation tridimensionnelle de sa région distale (1922 à 2016) semble moins organisée [98]. Cormier et coll. ont réalisé deux canaux chimériques par génération de codon stop dans la partie C-terminale. Le premier, L1921X, résulte en une diminution de courant sodique sans modification des paramètres biophysiques du canal. Le second, S1885X, qui mène à la perte de la sixième hélice α , diminue le courant sodique et affecte la cinétique d'inactivation du canal. En effet, elle augmente notablement la proportion de canaux incapables de s'inactiver durant une dépolarisation maintenue et ralentit le retour à l'état activable du canal. Ces résultats suggèrent que la partie constituée des six hélices α joue un rôle dans l'inactivation du canal. Cette structure en forme d'hélice-boucle-hélice (HBH sur la Figure 18) est très similaire à la structure de la calmoduline qui serait capable de lier le calcium [98]. Aussi, la régulation de l'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ ferait intervenir d'une part 3 régions du canal, la structure en hélice-boucle-hélice (HBH) de la partie C-terminale, le motif IQ (isoleucine 1908, glutamine 1909), la boucle d'inactivation entre les domaines DIII-DIV, et d'autre part, le calcium et la calmoduline (Figure 18). Le mécanisme de régulation de la porte d'inactivation fonctionnerait de la manière suivante.

Lorsque la concentration en Ca^{2+} est basse, la calmoduline se lierait fortement au motif IQ de $\text{Na}_v1.5$. En revanche, quand la concentration en Ca^{2+} augmente, la calmoduline lierait le Ca^{2+} et son affinité pour le motif IQ diminuerait. Ceci entraînerait une libération partielle du motif IQ. Ce dernier serait alors capable de se lier au motif hélice-boucle-hélice dont la structure tridimensionnelle est proche de celle de la calmoduline (Figure 18). Le couple calcium/calmoduline partiellement libéré possède une plus grande affinité pour le site de liaison à la calmoduline dépendant du Ca^{2+} , le CBD, pour Calmodulin Binding Domain, situé dans la boucle d'inactivation entre les domaines III et IV

(Figure 18) [99]. Le motif CBD et le motif IQ entreraient alors en compétition pour lier la calmoduline. Ainsi, l'interaction entre la boucle DIII-DIV et le domaine hélice-boucle-hélice (HBH) pourrait être directe ou indirecte médiée par la calmoduline [100, 101]. On notera que la liaison de la calmoduline avec le site CBD inhibe l'inactivation. En conséquence, toute mutation qui pourrait améliorer la liaison entre la calmoduline et le domaine CBD pourrait inhiber la formation d'une porte d'inactivation fonctionnelle [102, 103].

Les structures responsables de l'inactivation lente sont moins bien connues. Cependant, les boucles reliant les segments S4 et S5 qui bordent le canal pourraient intervenir dans ce processus par l'intermédiaire de changements conformationnels [104-106]. Par ailleurs, il a récemment été montré que la partie N-terminale du partenaire FHFIB jouerait le rôle de balle d'inactivation lente du canal, un phénomène qui sera décrit dans le chapitre V dédié aux partenaires [107-109].

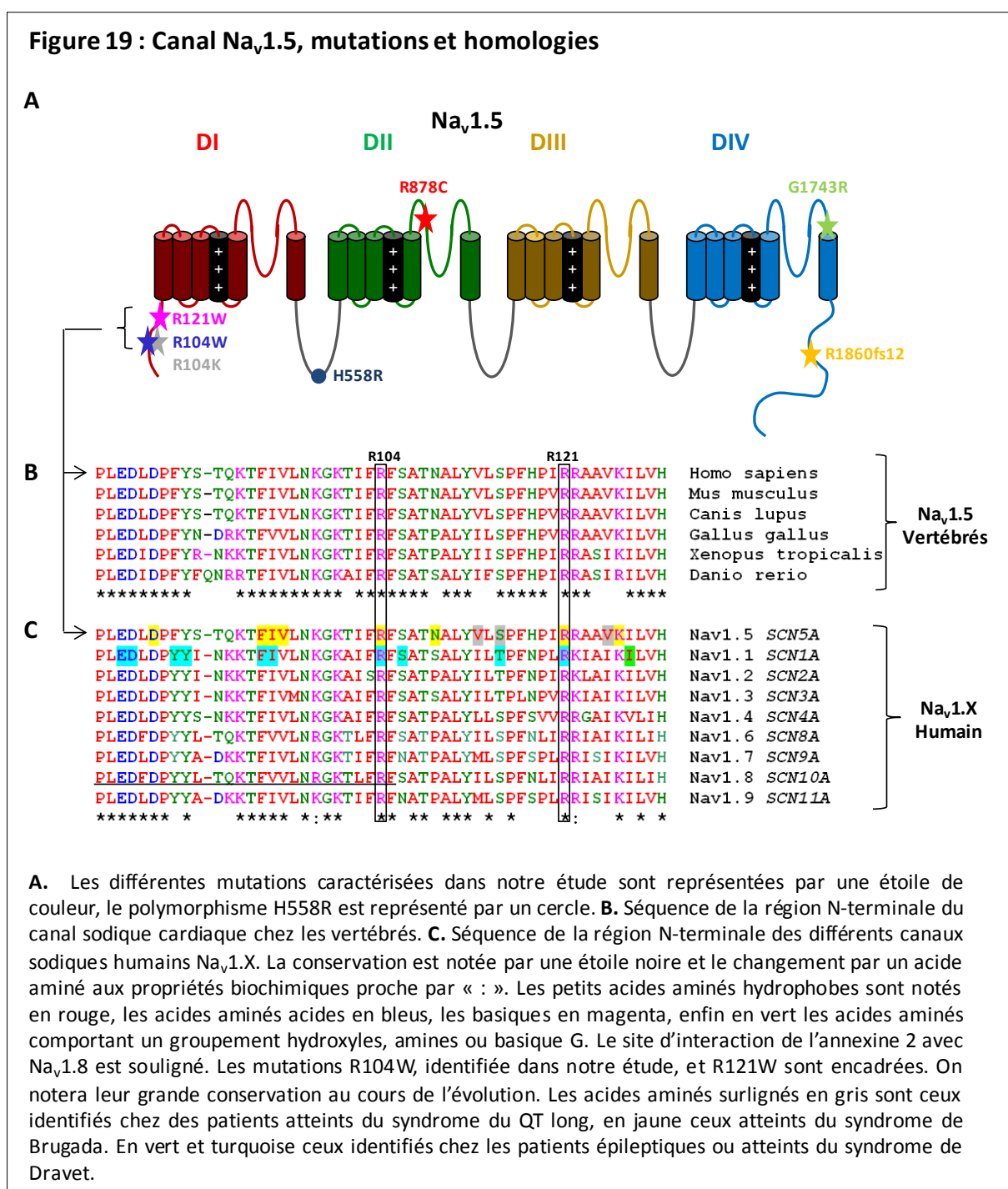
C/ La partie N-terminale des canaux sodiques dépendants du potentiel

Si beaucoup de régions fonctionnelles des canaux sodiques ont été étudiées suite à l'identification de mutations chez des patients, peu d'études se sont intéressées aux mutations de la partie N-terminale de ces canaux. Ainsi, ce paragraphe a pour rôle de résumer ces travaux.

En ce qui concerne le canal $Na_v1.5$, des mutations ont été identifiées chez des patients présentant des arythmies telles que le SBr, des troubles de la conduction ou le SQTl [21, 39]. Deux études fonctionnelles ont été réalisées sur ces mutations. Le canal sodique R121W- $Na_v1.5$, exprimé dans des cellules HEK293, n'est pas fonctionnel et semble être dégradé [39]. Une autre étude rapporte que le variant R43Q induirait un décalage hyperpolarisant de l'activation, mais seulement en présence de lidocaine [110].

Un plus grand nombre de mutations de cette région a été répertorié dans $Na_v1.1$ codé par le gène *SCN1A*. Ces mutations sont à l'origine de formes d'épilepsie infantile ou du syndrome de Dravet [111]. Il est intéressant de noter que pour les mutations R101W et R118S- $Na_v1.1$, les acides aminés affectés sont analogues à ceux du canal sodique cardiaque portant les mutations R104W et R121W- $Na_v1.5$. Ceci, associé à la conservation de la région suggère qu'elle pourrait avoir une fonction importante et peut-être similaire au sein de la famille des canaux $Na_v1.X$ (Figure 19).

La mutation S21P- $\text{Na}_v1.6$, identifiée chez des patients atteints d'ataxie sévère, semble être responsable *in vivo* de la rétention du canal dans l'appareil de Golgi et de la dégradation du canal muté. Néanmoins, dans un système d'expression hétérologue, les cellules HEK293, le trafic à la membrane et la fonction de ce canal semblent être restaurés par incubation des cellules à 30°C [112].



Le mutant Q10R- $\text{Na}_v1.7$, exprimé dans des cellules HEK293, induit un décalage hyperpolarisant de l'activation conduisant à une hyperexcitabilité des neurones des ganglions de la racine dorsale due à une réduction du seuil d'activation du potentiel d'action et conduit à une érythermalgie [113].

Lee et coll ont montré l'importance de la région N-terminale intracytoplasmique dans l'activation dépendante du potentiel de certains canaux sodiques. En effet, ces auteurs montrèrent que la région N-terminale des canaux sodiques $\text{Na}_v1.2$ et $\text{Na}_v1.6$ était responsable de leur seuil d'activation respectif [114].

Enfin, il est intéressant de noter que chez le rat, la chaîne légère de l'annexine2 (A2) est capable de se lier aux acides aminés 74 à 103 de la partie N-terminale du canal $\text{Na}_v1.8$ [115]. La coexpression de l'annexine2 dans des cellules CHO augmente la densité de ce canal à la membrane [116-119]. Les acides aminés analogues de $\text{Na}_v1.5$, de 76 à 105, sont relativement conservés entre les canaux $\text{Na}_v1.X$. Il a été montré que l'annexine2 ne se liait pas au canal sodique cardiaque et que cette interaction était assez spécifique du canal $\text{Na}_v1.8$ (Figure 19). Néanmoins, vingt membres de la famille des annexines ont été identifiés [120]. Les annexines A2, A5, A6, A7 sont exprimées dans le tissu cardiaque et jouent un rôle majeur dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que la fusion de membranes, la contractilité, ou l'expression à la membrane de certains récepteurs et canaux tel que l'échangeur Na^+/Ca^+ [121-123]. Ce dernier résultat laisse à penser que la partie N-terminale du canal sodique cardiaque pourrait aussi s'associer à des partenaires régulant son activité.

L'ensemble de ces études montrent que des mutations dans la région N-terminale des canaux sodiques dépendants du potentiel peuvent être à l'origine de perte ou de gain de fonction important, menant à des pathologies graves. Pourtant, le rôle de cette région dans la fonctionnalité des canaux sodiques reste grandement incompris.

D/ Régions de régulation post-traductionnelle

La fonction de $\text{Na}_v1.5$ peut être régulée par de nombreuses régulations post-traductionnelles (Figure 8). L'activation de protéines kinases, Fyn, PKA et PKC, sont connues pour réguler finement la cinétique d'inactivation du canal [124, 125]. La Fyn kinase est impliquée dans la phosphorylation de la tyrosine Y1495 située dans la boucle d'inactivation du canal entre le domaine KPQ charnière et la balle d'inactivation IFM (Figure 8) [124, 126]. La PKA est impliquée dans la phosphorylation des serines S525 et S528 [127]. La déphosphorylation fait intervenir la protéine tyrosine phosphatase HI (PTPHI) [128, 129]. La glycosylation est aussi suspectée de moduler l'activation du canal [130] alors

que d'autres modifications telles que l'ubiquitination pourrait réguler le recyclage de la protéine à la membrane [131]. Il est intéressant de noter que, de façon générale, la phosphorylation [132-135], la glycosylation [136, 137] et l'ubiquitination [132] sont des régulations post-traductionnelles conservées dans la famille des canaux sodiques dépendants du potentiel, ce qui est en accord avec l'évolution de cette famille de protéines. Enfin, tout récemment un nouveau type de régulation post-traductionnelle de $\text{Na}_v1.5$ a été mis en évidence. En effet, trois arginines, R513, R526 et R680, localisées dans la boucle intracellulaire liant les domaines DI et DII peuvent être méthylées [138]. Le rôle de ces modifications n'est pas encore clair, néanmoins R526 est situé dans le motif consensus de phosphorylation par la PKA et pourrait donc jouer un rôle dans la régulation de la phosphorylation de la protéine en position S525 et S528 [127]. Ces modifications pourraient être importantes pour l'interaction du canal avec des partenaires [138]. Les résidus R526 et R680 sont relativement conservés au sein de la famille des canaux sodiques alors que R513 est spécifique de $\text{Na}_v1.5$. De plus, des mutations affectant ces résidus ont été rapportées, R526H chez des patients atteints du SBr [21] et R680H chez un patient atteint décédé de mort subite infantile. Ce dernier mutant génère un courant lent persistant, en accord avec un phénotype de type SQT [139]. Ces données suggèrent que les méthylations des arginines pourraient jouer un rôle important dans la régulation du canal [138].

IV. Les sous-unités $\text{Na}_v\beta$: structure et fonctions

Les sous-unités $\text{Na}_v\beta$ font partie de la superfamille des molécules d'adhésion cellulaire, les CAM (Cell Adhesion Molecule). Les sous-unités α des canaux sodiques s'associeraient avec des sous-unités régulatrices β , soit de façon non covalente pour les sous-unités $\beta1$ et $\beta3$, soit covalente via un pont disulfure pour les sous-unités $\beta2$ et $\beta4$. Les sous-unités $\beta1$ à $\beta4$ sont codées par les gènes *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B*. Ce sont des protéines de 30 à 36 kD qui possèdent une partie C-terminale intracytoplasmique, un segment transmembranaire et une boucle extracellulaire de type « Immunoglobuline-like » dont la structure primaire, prédite par leur séquence, est similaire à celle de la protéine myéline P0, connue pour former une structure en sandwich de deux feuillets β tenus ensemble par des interactions hydrophobes et un pont disulfure (figure 20) [140, 141]. Ces molécules possèdent de nombreuses fonctions. Elles ne sont pas exprimées uniquement dans des tissus excitables et ont d'autres rôles que la modulation des courants sodiques. Elles sont impliquées dans le développement neural, dans l'adhésion et la migration cellulaire, dans le recrutement de protéines adaptatrices permettant l'interaction avec le cytosquelette ; elles sont la cible d'enzymes et elles interagissent avec des molécules de la signalisation cellulaire [142-144]. Plusieurs mutations ont été

identifiées dans ces sous-unités β chez des patients atteints d'épilepsie, d'ataxie ou d'autres canalopathies neuronales [145]. Bien que leur expression soit moindre que dans le système nerveux central et périphérique, elles sont toutes exprimées dans le cœur, localisées aux tubules T, aux stries Z et aux disques intercalaires. Dans le tissu cardiaque, elles jouent un rôle dans l'adhésion de $\text{Na}_v1.5$ à la structure du cytosquelette et à la matrice extracellulaire, dans sa localisation subcellulaire au sarcolemme, ainsi que dans la modulation de ses paramètres biophysiques [142]. Toutes les sous-unités β possèdent un site de clivage extracellulaire par BACE1 (pour β -site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme 1) qui pourrait jouer un rôle dans la croissance neuronale [144], ainsi qu'un site de clivage intracellulaire par la γ -sécrétase (Figure 16) [144] qui produit un petit fragment intracellulaire. Dans le cas de la sous-unité $\beta 2$, le fragment libéré est transloqué dans le noyau et associé à une augmentation des ARNm de *SCN1A*, suggérant qu'il agirait comme un facteur de transcription [146]. De plus, l'inhibition spécifique de la γ -sécrétase par le *N*-[*N*-(3,5-difluorophenylacetyl-L-alanyl)]-*S*-phenylglycine *t*-butylester (DAPT) réduit l'adhésion et la migration cellulaire dépendante de la sous-unité $\beta 2$ suggérant que ce fragment intracellulaire est important dans la régulation de ces fonctions [147]. A ce jour, le rôle des deux sites de clivage des différentes sous-unités n'est pas connu dans la fonction cardiaque.

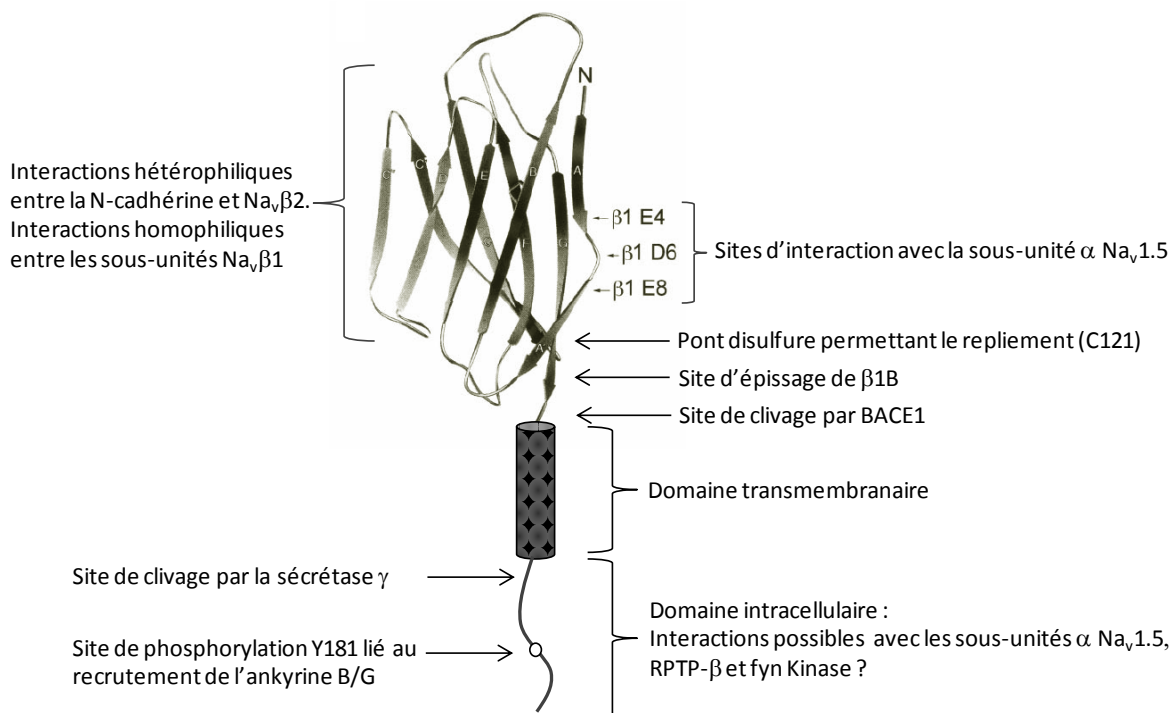
Plusieurs variants dans les gènes *SCN1B* à *SCN4B* ont été identifiés dans différentes arythmies cardiaques. Néanmoins, le lien entre ces variants génétiques et le phénotype clinique reste mal connu. Ces variants sont localisés principalement dans la région extracellulaire N-terminale des sous-unités β . Ceci suggère que cette région extracellulaire des sous-unités β est importante dans l'interaction et la régulation de la sous-unité α , $\text{Na}_v1.5$.

A/ Les sous-unités $\text{Na}_v\beta 1$ et $\text{Na}_v\beta 1B$

Grâce à son domaine « immunoglobuline-like » extracellulaire, la sous-unité $\beta 1$ est capable d'interagir avec d'autres $\beta 1$ ou avec des N-cadhérines (Figure 20) [148]. Elle joue ainsi un rôle important dans l'adhésion cellulaire aux points de contacts focaux (points de contact cellule-cellule). Malhotra et coll. ont aussi montré que sa partie intracellulaire C-terminale était capable de recruter les ankyrines B et G aux points de contacts focaux. L'absence de cette partie C-terminale ou l'altération de la Tyrosine 181 de la sous-unité $\beta 1$ entraînent la perte de sa capacité à recruter l'ankyrine aux jonctions intercellulaires [149]. Par la suite, ces auteurs ont montré que la phosphorylation de la Tyrosine 181 de la sous-unité $\beta 1$ abolit l'interaction de celle-ci avec l'ankyrine. La sous-unité $\beta 1$ phosphorylée serait localisée aux disques intercalaires alors que la $\beta 1$ non

phosphorylée serait liée à l'ankyrine et localisée aux tubules T [150]. Ceci suggère qu'il puisse exister deux « pools » de sous-unités $\beta 1$: un pool phosphorylé aux disques intercalaires, l'autre, lié à l'ankyrine aux tubules T. Par ailleurs, dans le système nerveux, la sous-unité $\beta 1$ s'associe au récepteur phosphotyrosine phosphatase β , RPTP β , ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une régulation par la phosphorylation [128].

Figure 20 : Structure de la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$



Adapté de : Mc Cormick et Isom, J Biol Chem 1998

La sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$ possède un segment transmembranaire et une région C-terminale intracellulaire. La structure de la région extracellulaire « immunoglobuline-like » est déduite par homologie de séquence.

Le gène *SCN1B* code pour deux isoformes de sous-unités $\beta 1$, nommées $\beta 1$ et $\beta 1B$, issues d'un épissage alternatif qui permet à l'intron 3 de devenir en partie codant. La sous-unité $\beta 1B$ ne possède pas de domaine transmembranaire et serait une protéine sécrétée [145, 151, 152]. Si son expression est faible dans le cœur comparée au cerveau [151], la sous-unité $\beta 1$ coimmunoprécipite et colocalise avec $\text{Na}_v 1.5$ déjà à l'intérieur du réticulum endoplasmique, suggérant qu'elles puissent jouer un rôle dans le transport du complexe jusqu'à la membrane [153] [154]. Il est accepté que la sous-unité $\beta 1$ possède plusieurs sites d'interaction avec le canal. Une interaction de la partie extracellulaire de la

sous-unité $\beta 1$ avec les boucles liant les segments S5-S6 des domaines I, III et IV de $\text{Na}_v1.5$ serait requise pour une régulation de l'ouverture du canal [148, 155, 156] (Figure 8).

Dans des systèmes d'expression hétérologue, la coexpression des ADNc de *SCN5A* et *SCN1B* a montré des effets variables de la sous-unité $\beta 1$ sur l'ouverture du canal, dépendant du système utilisé. Cependant, dans la plupart des cas, une augmentation du pic de courant I_{Na} [152, 157-159], un décalage dépolarisant de 5 à 15mV de la courbe d'inactivation [153, 159, 160] et une diminution du courant I_{Na} persistant [160, 161] sont observés, alors que la courbe d'activation ne semble pas être affectée, sauf dans une étude (Tableau 3) [160]. Des études récentes ont montré que le courant tardif I_{NaL} de $\text{Na}_v1.5$ est augmenté en présence de $\beta 1$ dans les cellules tsA201 [162], mais aussi dans des cardiomyocytes de chien [163]. Ce courant joue un rôle important dans la durée du potentiel d'action, ainsi la présence de la sous-unité $\beta 1$ pourrait allonger la phase plateau du potentiel d'action [163]. De plus, il est intéressant de noter qu'il existe une interaction directe entre la partie C-terminale de $\text{Na}_v1.1$ et la région intracytoplasmique des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ [164]. Cette région très conservée entre $\text{Na}_v1.1$ et $\text{Na}_v1.5$ suggère que ce dernier pourrait aussi interagir par cette région avec la sous-unité $\beta 1$. Par ailleurs, cette région du canal $\text{Na}_v1.5$ est déjà connue pour jouer un rôle dans son inactivation. Cette dernière observation suggère que la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$ pourrait intervenir dans ces mécanismes pour réguler le courant I_{NaL} [163]. Enfin, il a été récemment montré que la régulation de l'activité de $\text{Na}_v1.5$ par $\text{Na}_v\beta 1$ variait avec l'état de polymérisation de la tubuline [165]. L'ensemble de ces résultats montrent la complexité des mécanismes de régulation de $\text{Na}_v1.5$ par la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$.

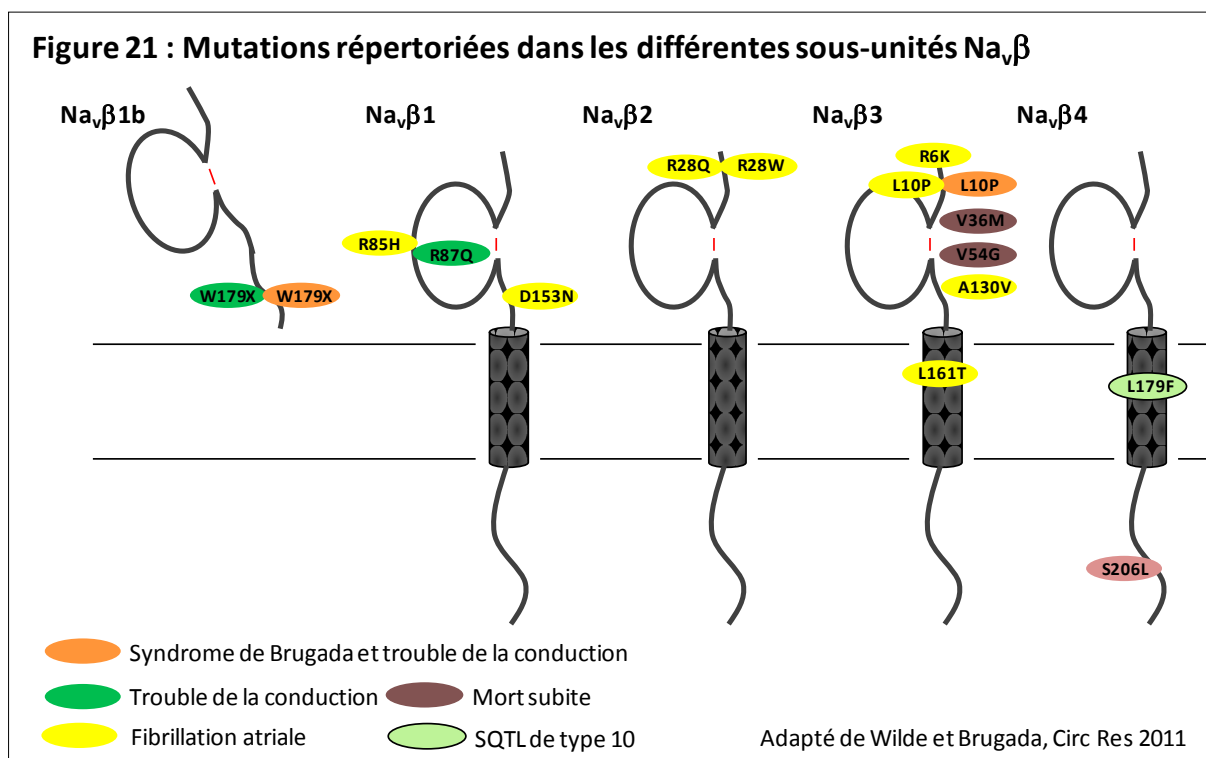
L'inactivation génique de *SCN1B* chez la souris a des conséquences neurologiques et cardiaques. En effet, ces souris présentent des problèmes de croissance et meurent avant d'avoir atteint l'âge adulte, probablement suite à des problèmes neurologiques [166]. Par ailleurs, elle provoque une diminution de la fréquence cardiaque et un retard de la repolarisation ventriculaire. Un allongement du QT est observé à l'ECG, causé par une prolongation du PA. Cette dernière est due à une augmentation du courant persistant I_{Na} associée à une surexpression d'ARNm de $\text{Na}_v1.5$. Néanmoins, les autres propriétés biophysiques du courant I_{Na} chez ces souris ne semblent pas être altérées. [166]. En accord avec ces résultats, la mutation D1790G de $\text{Na}_v1.5$, qui semble altérer l'interaction entre le canal et la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$, a été identifiée chez des patients présentant une bradycardie et un intervalle QTc allongé [42]. Les résultats discordants obtenus dans des systèmes d'expression hétérologue et chez l'animal soulignent la limite des deux approches et suggère que les systèmes d'expression hétérologue ne pourraient pas mimer le système physiologique du canal, en particulier les interactions entre les différents partenaires présents dans les cardiomyocytes.

Chez l'Homme, des mutations dans le gène *SCN1B*, telle que la mutation R85H, ont été identifiées chez des patients atteints d'épilepsie familiale de type GEFS+ (General epilepsy with febrile seizure) [167]. Néanmoins, il semble qu'aucune arythmie cardiaque n'ait été identifiée chez ces patients. Réciproquement aucune crise épileptique n'a été rapportée chez les patients atteints de trouble de la conduction ou de SBr présentant des mutations de la sous-unité $\beta 1$ [167]. Les mutations E87Q et W179X de la sous-unité $\beta 1$ et $\beta 1B$ ont été identifiées chez des patients atteints de trouble de la conduction ou de SBr (Figure 21) [168]. De plus, deux mutations, R85H et D153N, ont été rapportées chez des patients atteints de fibrillation atriale (Figure 21) [167]. La coexpression de la sous-unité $\beta 1$ portant ces différentes mutations et de $Na_v1.5$ dans des lignées cellulaires diminue le courant sodique par rapport à une coexpression avec la $\beta 1$ sauvage (Tableau 3). Ces résultats suggèrent que ces mutations jouent un rôle dans l'augmentation du nombre de canaux $Na_v1.5$ au sarcolemme dans les cardiomyocytes ventriculaires et auriculaires. De plus, les mutations W179X, E87Q et R85H décalent la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs, indiquant que l'activation du canal est retardée. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus chez des patients portant des mutations de *SCN5A* menant à une réduction du courant I_{Na} et à l'origine de pathologies telles que le SBr, les CCD, et certains cas de la FA [169]. Néanmoins, les familles atteintes étant trop petites, un lien formel entre ces variants et la pathologie reste difficile à affirmer [170].

B/ La sous-unité $Na_v\beta 2$

La sous-unité $Na_v\beta 2$ et le canal $Na_v1.5$ coimmunoprécipitent et colocalisent aux disques intercalaires [153, 171]. L'effet de la sous-unité $\beta 2$ sur le courant sodique cardiaque est lui aussi très discuté. Certaines études montrent que la coexpression de cette sous-unité avec le canal $Na_v1.5$ ne modifie pas les propriétés biophysiques du canal sodique [154, 172], alors que d'autres rapportent que la coexpression de la sous-unité $\beta 2$ avec $Na_v1.5$ décale la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs [167]. Il a été montré que l'expression du fragment intracellulaire de la sous-unité $\beta 2$ était capable de produire cet effet. Ainsi ce dernier jouerait un rôle dans l'ouverture dépendante du potentiel du canal $Na_v1.5$ [173]. Récemment, Mishra et coll. ont montré que l'inhibition génique de $Na_v\beta 2$ dans des cardiomyocytes de chien conduit à une augmentation du courant lent I_{NaL} et à la prolongation de la phase plateau du potentiel d'action (Tableau 3). Ceci suggère que cette sous-unité pourrait favoriser l'inactivation du canal. Il est intéressant de noter que cet effet est l'inverse de ce qui a été observé pour la sous-unité $Na_v\beta 1$ [163]. Une étude récente révèle que l'effet de $Na_v\beta 2$ sur $Na_v1.5$ dépend de la présence d'acide sialique sur des résidus glycosylés de $Na_v\beta 2$. La sialylation de $Na_v\beta 2$ cause un décalage réversible de l'activation vers des potentiels plus négatifs [174]. Par ailleurs,

Watanabe et coll. ont identifié des mutations dans *SCN2B* chez des patients atteints de fibrillation atriale [167]. Ces mutations, R28W et R28Q, sont localisées dans la partie N-terminale de la protéine, leur coexpression avec le canal diminue la densité du courant I_{Na} et décale l'activation vers des potentiels plus positifs par rapport à la coexpression avec la $\beta 2$ sauvage [167]. Ces deux effets mènent à une diminution du courant I_{Na} , ce qui est en accord avec le phénotype des patients présentant des ECG proches des patients SBr. La sous-unité $\beta 2$ ne semble être pas colocalisée avec le canal sodique cardiaque dans le Réticulum Endoplasmique. Les deux sous-unités seraient donc transportées séparément jusqu'au sarcolemme [153]. Néanmoins, la diminution de la densité de courant par le mutant $\beta 2$ suggère que cette sous-unité est malgré tout importante dans la fonction du canal $Na_v1.5$ à la membrane. Ainsi, ces mutations pourraient altérer la glycosylation de $Na_v\beta 2$ et moduler l'activation dépendante du potentiel du canal.



C/ La sous-unité $Na_v\beta 3$

La sous-unité $Na_v\beta 3$ coimmunoprécipite avec le canal $Na_v1.5$ [175]. Dans une étude il a été montré par northern Blot et western blot chez le mouton que cette sous-unité était exprimée dans les ventricules et les fibres de Purkinje, mais pas dans les oreillettes [158]. La surexpression dans les œufs de xénope de la sous-unité $\beta 3$ augmente la densité de courant de $Na_v1.5$ et décale la courbe d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés [158]. Ou bien, elle ne change pas l'intensité de

courant et décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs dans les cellules CHO et dans les cellules HEK293 (Tableau 3) [161, 175]. Ces études montrent une fois encore la variabilité des résultats obtenus dans des systèmes d'expression hétérologue, qui peut être due au type cellulaire et aux conditions expérimentales. Il est intéressant de souligner que la coexpression de $Na_v1.5$ avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ semble avoir un effet additionnel sur le décalage de la courbe d'inactivation vers des différences de potentiels plus négatives suggérant que les sous-unités $Na_v\beta$ pourraient agir de façon synergique pour réguler l'ouverture du pore [161].

Les souris issues d'une invalidation génique du gène *SCN3B* présentent une fréquence cardiaque plus faible et un intervalle PR prolongé, indiquant un ralentissement de la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire [176]. De plus, les études électrophysiologiques montrent une susceptibilité de ces souris à développer des tachycardies atriales, fibrillations atriales et tachycardies ventriculaires, indiquant une arythmogénicité accrue des myocytes atriaux et ventriculaires. Les myocytes ventriculaires des souris n'exprimant pas $Na_v\beta 3$ montrent une diminution de la densité de courant I_{Na} et un décalage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs comparés à ceux des myocytes ventriculaires de souris sauvages [176]. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les œufs de xénope [158]. Néanmoins, comme pour les autres sous-unités β , les résultats obtenus dans les cellules HEK293 et CHO sont contradictoires, illustrant la difficulté d'élucider le rôle physiologique de ces unités β .

A ce jour, plusieurs mutations *SCN3B* sont associées à des phénotypes arythmiques chez l'Homme. Wang et coll. ont identifié chez un patient atteint de fibrillation atriale la mutation A130V localisée dans la partie N-terminale (Figure 21) [177]. L'expression de ce mutant est associée à une diminution du courant sodique et ne change pas les propriétés biophysiques du canal. Néanmoins, la quantité de canaux à la membrane serait inchangée. Ces auteurs émettent l'hypothèse que cette mutation affecte l'ouverture du canal, mais pas son transport à la membrane. Les mutations L10P et V54G de $Na_v\beta 3$ ont été identifiées chez un patient atteint du SBr et un patient ayant fait un arrêt cardiaque avorté, en l'absence d'anomalie structurale du cœur et d'arythmies bien définies [175, 178]. L'expression de ces mutants avec $Na_v1.5$ résulte en une réduction importante du courant sodique, qui semble être due à une perte du nombre de canaux sodiques à la membrane (Tableau 3). De plus, le mutant V54G de $Na_v\beta 3$ semble décaler l'inactivation vers des potentiels positifs. Récemment, les mutations V54G et V36M ont aussi été associées à des morts subites infantiles (MSI) [179]. La coexpression du mutant V36M de $Na_v\beta 3$ avec le canal diminue le courant sodique mais augmente le courant lent persistant, conduisant à un gain de fonction [179]. Enfin, trois nouvelles

mutations situées dans le segment transmembranaire de $Na_v\beta3$ ont été associées à des fibrillations atriales chez des patients isolés, R6K, L10P et M161T (Figure 21) [180].

La majorité des mutations de *SCN3B* ont été trouvées dans la partie N-terminale de la protéine suggérant l'importance de cette région pour l'expression et les propriétés d'ouverture du canal sodique cardiaque.

Sous-unité	Effets sur I_{Na} des sous-unités sauvages	Variants	Localisation	Phénotypes	Effets sur I_{Na} des sous-unités mutées
$\beta1b$	Augmentation du pic de courant [161]	W179X	C-ter (extracellulaire)	SBr et CCD	Diminution du pic de courant [161] Décalage positif de la courbe d'activation
$\beta1$	Augmentation du pic de courant [145, 150-152] Décalage positif de la courbe d'inactivation [146, 152, 153] Augmentation du courant tardif I_{NaL} [156]	E87Q	N-terminal	CCD	Diminution du pic de courant [161] Décalage positif de la courbe d'activation
		R85H	N-terminal	FA	Diminution du pic de courant [160] Décalage positif de la courbe d'activation Décalage négatif de la courbe d'inactivation
		D153N	N-terminal	FA	Diminution du pic de courant [160]
$\beta2$	Décalage positif de la courbe d'activation [166] (dépendrait de la sialylation de $Na_v\beta2$) [167] Diminution du courant tardif I_{NaL} [156] (effet inverse de la sous-unité $\beta1$)	R28W	N-terminal	FA	Diminution du pic de courant [160] Décalage positif de la courbe d'activation
		R28WQ	N-terminal	FA	Diminution du pic de courant [160] Décalage positif de la courbe d'activation Décalage positif de la courbe d'inactivation
$\beta3$	Augmentation du pic de courant (dans l'ovocyte de Xénope [151] pas dans les HEK293 et CHO [154, 168])	R6K	N-terminal	FA	Diminution du pic de courant [168, 171]
		L10P	N-terminal	Brs et FA	Diminution du pic de courant [168, 171] Décalage négatif de la courbe d'inactivation
	Décalage négatif de courbe d'inactivation [151] (l'effet serait additif à l'effet $\beta1$ [154])	V54G	N-terminal	FV et MSI	Diminution du pic de courant [168, 171] [172] Décalage positif de la courbe d'activation Décalage positif de la courbe d'inactivation
		V36M	N-terminal	MSI	Diminution du pic de courant [172] Augmentation du courant I_{Na} persistant
		A130V L161T	N-terminal transmembranaire	FA FA	Diminution du pic de courant [170] Diminution du pic de courant [173]
$\beta4$	Décalage négatif de courbe d'inactivation [172, 174]	L179F	transmembranaire	LQTS 10	Augmentation du courant I_{Na} persistant [174] Décalage positif de la courbe d'inactivation
		S206L	C-terminal (intracellulaire)	MSI	Augmentation du courant I_{Na} persistant [172] Décalage positif de la courbe d'inactivation

Adapté de Wilde et Brugada Circ Res 2011

D/ La sous-unité $Na_v\beta4$

La sous-unité $\beta4$ coimmunoprécipite avec le canal $Na_v1.5$ [181-183]. La coexpression de $Na_v\beta4$ avec $Na_v1.5$ ne change pas la densité de courant mais décale l'inactivation vers des différences de potentiels plus négatives (Tableau 3) [179, 183].

Les mutations du gène *SCN5A* sont associées le plus souvent à un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire. Néanmoins, le phénotype et la sévérité de la maladie chez les patients portant la même mutation est très variable. Ceci peut s'expliquer par la présence d'un ensemble de variants génétiques modificateurs présents ou non chez les porteurs des mutations *SCN5A*. Remme et coll. ont étudié des souris transgéniques ayant différents fonds génétiques mais

portant la même mutation, 1795insD, identifiée préalablement chez des patients atteints de troubles de la conduction ou de SBr [181] [184]. Il est apparu que la souris 129P2 présentait un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire beaucoup plus important que la souris FVB/N, ainsi qu'un retard d'ouverture du canal sodique dans les cardiomyocytes, lié à un décalage vers des valeurs positives de la courbe d'activation. Une analyse du profil d'expression des ARNm et des protéines cardiaques a révélé que la sous-unité $\beta 4$ était moins exprimée chez ces souris 129P2 que chez les souris FVB/N. Il a été proposé que le décalage de l'activation puisse être lié à la variation d'expression de la sous-unité $\beta 4$ [181]. Cette étude suggère que la sous-unité $\beta 4$ du canal sodique cardiaque pourrait être un gène modificateur de la sévérité des phénotypes chez les individus ayant une mutation dans *SCN5A*. Néanmoins, il est à noter que l'expression d'autres gènes était différente entre les deux souches de souris et que leur contribution au phénotype n'a pas été étudiée [181] [185]. Cette étude montre l'importance du fond génétique pour l'expression de mutations *SCN5A* chez la souris.

La contribution de la sous-unité $\beta 4$ dans la pathologie cardiaque a été révélée par l'identification de deux mutations chez des patients atteints de mort subite infantile. Les mutations de ce gène sont associées au phénotype SQTl de type 10 [183]. Les mutations, L179F et S206L, sont localisées dans le segment transmembranaire et dans la partie C-terminale intracellulaire (Figure 21) [179, 183] de $\text{Na}_v\beta 4$. La coexpression de ces mutants avec $\text{Na}_v1.5$ dans des cellules HEK293 implique une augmentation d'un courant persistant et un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs comparée à la coexpression de $\text{Na}_v1.5$ avec $\text{Na}_v\beta 4$ sauvage. Ceci implique une augmentation du courant sodique de fenêtre [179, 183]. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus dans des cardiomyocytes de rats infectés par un adénovirus contenant le mutant S206L qui présentent une augmentation du courant persistant ainsi qu'une prolongation du potentiel d'action [179]. Les effets observés pour ces deux mutants *SCN4B* sur l'augmentation du courant persistant sont en accord avec les effets déjà décrits précédemment pour les mutations *SCN5A* liées au SQTl [23].

V. Les partenaires du canal sodique cardiaque Na_v1.5

La sous-unité α du canal sodique cardiaque est la protéine constituant le pore du canal ionique. Elle est fonctionnelle seule, mais reste néanmoins la pièce centrale d'un complexe canalaire beaucoup plus important. Ce complexe, qui comprend de nombreux partenaires est très difficile à étudier dans son intégralité. Ces protéines peuvent réguler sa fonction, son expression à la membrane et sa localisation subcellulaire (Tableau 4). Des mutations dans les gènes codant ces partenaires ont aussi été identifiées dans des pathologies cardiaques telles que le SQTl congénital [186] ou le syndrome de Brugada [187]. Les protéines partenaires du canal sodique peuvent être classées comme (1) des protéines d'ancrage ou adaptatrices, ce sont des protéines qui jouent un rôle dans le transport et la localisation subcellulaire du canal, (2) des enzymes capables d'interagir et de modifier la structure du canal comme les tyrosines kinases, les ubiquitines ligases, impliquant des modifications post-traductionnelles; et enfin (3) des protéines capables de modifier les propriétés biophysiques du canal (Tableau 4). Le but de ce chapitre est de passer en revue les partenaires déjà connus, de mieux comprendre comment ils peuvent réguler la biologie et la fonction du canal et d'évaluer leur implication dans les arythmies.

Tableau 4: Les partenaires connus de Na_v1.5

Protéine	Type de protéine	Principaux effets sur Na _v 1.5	Site de liaison à Na _v 1.5
Ankyrine G	Protéine d'ancrage	Transport à la membrane	VPIAxxSD motif dans la boucle II-III
Syntrophine	Protéine d'ancrage	Protéine adaptatrice au complexe dystrophine	Domaine PDZ en C-terminal
MOG1	Protéine d'ancrage	Transport; augmente I _{Na}	Boucle II-III
α -actinine-2	Protéine d'ancrage	Augmente I _{Na}	
Nedd4	Enzyme	Ubiquitinylation et internalisation	Motif PY en C-terminal
Calmoduline kinase II δ c	Enzyme	Phosphorylation site inconnu et modulation de l'activité biophysique	Non déterminé
PTPH1	Enzyme	Phosphorylation site inconnu et modulation de l'activité biophysique	Motif PDZ en C-terminal
14-3-3 eta	Altérations Biophysiques	Modulation de l'inactivation	Boucle I-II
Cavéoline-3	Altérations Biophysiques	Les mutants cavéoline induisent un courant persistant	Non déterminé
FHF1B	Altérations Biophysiques	Modulation de l'inactivation, porte d'inactivation lente	Résidu 1773-1832 en C-terminal
Calmoduline	Altérations Biophysiques	Effets divergents	Motif IQ résidu 1900-1920 de la boucle III-IV
GPD1L	Altérations Biophysiques	Les mutants diminuent I _{Na} en système d'expression hétérologue	Pas d'interaction connue
Téléthonine	Altérations Biophysiques	Modulation de l'activation	Non déterminé
Plakophiline-2	Protéine d'ancrage et Altérations Biophysiques	Inhibition génique réduit I _{Na} , décalage négatif de l'inactivation, et ralentit le retour à l'état activable	Non déterminé

Modifié de Abriel, J Mol Cell Cardiol 2010

A/ Les protéines d'ancrage ou adaptatrices

A.1/ L'ankyrine-G / syndrome de Brugada de type 8

Les ankyrines organisent, transportent et ancrent les canaux ioniques au cytosquelette d'actine et de spectrine [188]. Trois gènes codent pour les différentes ankyrines, (*ANK1*, *ANK2*, *ANK3*). Les ankyrines B et G, codées par *ANK2* et *ANK3*, sont exprimées dans le cœur [188]. Des variants du gène *ANK2* ont été identifiés dans certaines pathologies cardiaques telles que le SQTL de type 4 [189], des dysfonctions du nœud sinusal, la fibrillation auriculaire, des troubles de la conduction et des morts subites, définissant ainsi un « syndrome cardiaque ankyrine B » [190]. Il n'y a cependant aucune évidence que le courant sodique puisse être directement régulé par l'ankyrine B, bien que chez les souris déficientes en ankyrine B, le courant sodique des myocytes présente un courant tardif similaire à celui observé chez les patients atteints de SQTL de type 3 dont le canal sodique est muté [191]. L'ankyrine G interagit directement avec le motif de liaison à l'ankyrine dans la boucle liant les domaines II et III de $\text{Na}_v1.5$ [192] (Figure 22). Une mutation dans $\text{Na}_v1.5$, E1053K, a été trouvée dans ce motif chez un patient atteint du syndrome de Brugada. Elle empêche la liaison entre les deux partenaires [193]. L'expression de $\text{Na}_v1.5$ sauvage et mutant dans des cardiomyocytes adultes, *via* une infection virale, montre que le canal sauvage est capable d'atteindre la membrane plasmique alors que le canal E1053K est retenu dans des compartiments intracellulaires [193]. Ces résultats ont été confirmés par la suite, par des expériences d'inhibition génique de l'ankyrine-G dans des cardiomyocytes néonataux qui présentent une réduction d'expression de $\text{Na}_v1.5$ ainsi qu'une diminution du nombre de canaux à la membrane [194]. Ces résultats suggèrent que *ANK3* devrait être ajouté à la liste des gènes candidats des arythmies cardiaques causées par une réduction de la fonction de $\text{Na}_v1.5$.

A.2/ La syntrophine $\alpha 1$ / SQTL de type 12

Il a été montré que $\text{Na}_v1.5$ interagissait avec la dystrophine de façon indirecte *via* une protéine adaptatrice, la syntrophine $\alpha 1$ (*SNTA1*) [129]. Le domaine PDZ de la syntrophine interagit avec un motif constitué des trois derniers acides aminés de $\text{Na}_v1.5$: sérine-isoleucine-valine (SIV) (Figure 22) [195]. Précédemment, il a été montré que la syntrophine interagissait avec la nitrique oxyde synthase (NOS) qui est exprimée de façon constitutive dans le cœur et l'ATPase dépendante du couple Ca^{2+} /calmoduline (*PMCA4b*) [196, 197]. En présence de *SNTA1*, *PMCA4b* agit comme inhibiteur de la production de NO par la NOS. Il est important de noter que le NO augmente le courant I_{NaL} du cardiomyocyte [198]. De ces résultats, Ueda et coll. ont suggéré que des mutations dans *SNTA1* pourraient rompre la liaison avec *PMCA4b*, en annulant la capacité de *PMCA4b* d'inhiber

NOS, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la concentration de NO et le courant I_{NaL} [199]. Ces auteurs ont identifié la mutation A390V dans SNTA1 chez un individu isolé. Des expériences de GST-pull down ont révélé une interaction entre la partie C-terminale de $Na_v1.5$, NOS, PMCA4b et la SNTA1. La mutation A390V dans SNTA1 rompt sélectivement l'interaction de PMCA4b avec $Na_v1.5$ et NOS. Ce mécanisme est associé à une augmentation de la nitrosylation de $Na_v1.5$. De plus, la coexpression dans des cellules HEK293 de $Na_v1.5$, NOS, PMCA4b et du mutant A390V augmente le courant persistant I_{Na} et décale l'inactivation vers des potentiels positifs, menant à un élargissement du courant de fenêtre entrant comparé à la coexpression avec la syntrophine sauvage. Ce gain de fonction est aboli dans les cellules incubées avec du L-NG-monométhyl arginine (L-NMMA), un inhibiteur de NOS. La surexpression du mutant A390V dans des cardiomyocytes augmente aussi le courant sodique persistant par rapport aux cellules exprimant la forme sauvage [199]. Ces données montrent que NOS, PMCA4b, et SNTA1 jouent un rôle clé dans la régulation de la nitrosylation de $Na_v1.5$ et dans l'amplitude du courant I_{Na} persistant. Wu et coll. ont également identifié la mutation A257G chez trois patients SQTL [200]. Ce mutant augmente le courant sodique et décale l'activation vers des différences de potentiels négatives, résultant à nouveau en un élargissement du courant de fenêtre entrant dans les cellules HEK293 et les cardiomyocytes. Bien que cette mutation ne semble pas augmenter le courant persistant, les effets sont similaires à ceux retrouvés chez les patients atteints de SQTL de type 3 chez lesquels $Na_v1.5$ est muté [23]. Enfin, des mutations dans la syntrophine ont aussi été retrouvées chez des patients atteints de MSI [201]. Cheng et coll. ont identifié six variants dans SNTA1: G54R, P56S, T262P, S287R, T372M et G460S chez huit patients. Il est intéressant de noter que la coexpression dans des cellules HEK293 de $Na_v1.5$ avec les mutants G54R et P56S ne semblent pas altérer le courant sodique par rapport à la coexpression avec la syntrophine sauvage. Le mutant T262P augmente le courant sodique alors que S287R, T372M et G460S ont des effets similaires au mutant A390V cité ci-dessus: une augmentation du courant persistant I_{Na} et un décalage de l'inactivation vers des potentiels positifs.

Dans le cœur des souris *mdx* déficientes en dystrophine, un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne, la quantité de protéines $Na_v1.5$ est diminuée [129]. La diminution d'expression de $Na_v1.5$ implique une perte de courant I_{Na} à l'échelle de la cellule, conduisant à des défauts de conduction visibles à l'ECG et par une augmentation de la durée du QRS. La diminution d'expression de $Na_v1.5$ n'est pas corrélée avec une diminution d'ARNm de *SCN5A* [129], suggérant un défaut traductionnel ou un manque de stabilité de la protéine en l'absence de dystrophine. Une étude récente montre que l'utrophine fait aussi partie de ce complexe multi-protéique. C'est une protéine homologue à la dystrophine surexprimée dans les muscles des souris *mdx* qui pourrait

compenser l'absence de dystrophine, expliquant ainsi le phénotype moins sévère. Cette protéine est aussi capable de se lier à la syntrophine et donc au canal sodique cardiaque [202]. Cette dernière étude montre chez des souris issues de la double invalidation génique pour la dystrophine et l'utrophine, une perte de courant sodique encore plus importante. Il a aussi été récemment montré que le complexe $\text{Na}_v1.5$ -syntrophine-dystrophine était localisé à la membrane latérale des cardiomyocytes, contrairement au complexe $\text{Na}_v1.5$ -SAP97 qui est localisé aux disques intercalaires, suggérant qu'il puisse exister deux pools de canaux sodiques [203].

A.3/ La SAP97

La SAP97 (Synapse Associated Protein) fait partie des protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) qui sont caractérisées par de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine incluant les domaines PDZ. Elles sont impliquées dans la fonction et la localisation de nombreux canaux ioniques des neurones et de cellules épithéliales, principalement aux jonctions cellule-cellule. Peu de choses sont connues sur la fonction de ces protéines dans le tissu cardiaque [203], néanmoins la SAP97 et ZO-1 (*Zonula Occludens*) sont les MAGUK les plus exprimées dans ce tissu. Il a aussi été montré que la SAP97 était capable de se lier aux canaux $\text{K}_v4.2$ et $\text{K}_v4.3$ et dans les cardiomyocytes de rat, la surexpression de SAP97 augmente la densité des canaux $\text{K}_v4.x$ [204]. Il est intéressant de noter que dans les neurones, PSD95 (une autre MAGUK très proche de la SAP97) rassemble les canaux et les enchâsse dans la membrane [203]. La SAP97 se lie aussi au motif SIV de $\text{Na}_v1.5$; les deux protéines sont colocalisées aux disques intercalaires des cardiomyocytes mais pas à la membrane latérale contrairement à la syntrophine qui est colocalisée avec le canal à la membrane latérale (Figure 22). Ceci suggère l'existence de deux « pools » de canaux $\text{Na}_v1.5$ dans les cardiomyocytes, un à la membrane latérale des cardiomyocytes (tubules T) associé au complexe syntrophine-dystrophine, et l'autre localisé aux disques intercalaires lié à SAP97 [203]. Cependant la fonction de ces deux pools de canaux reste encore à éclaircir.

A.4/ MOG1 / syndrome de Brugada de type 11

La protéine MOG1 (Multicopy suppressor Of Gsp1) est une petite protéine de 29KD codée par le gène *RANGRF*. MOG1 se lie aux protéines nucléaires liant le GTP, RAN (**RA**s-related **N**uclear protein). En conséquence, elles ont un rôle dans la régulation du transport de protéines nucléaires [205]. MOG1 est localisé dans le cytoplasme et dans le noyau de cellules cardiaques, et ses ARN messagers sont très exprimés dans le tissu cardiaque [205]. MOG1 interagit avec la boucle intracellulaire liant les domaines II et III de $\text{Na}_v1.5$ (Figure 22). Ces protéines colocalisent dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris, principalement aux disques intercalaires. La coexpression de cette protéine

avec le canal dans des cellules HEK293 augmente le courant sodique sans altérer ses propriétés biophysiques, suggérant que MOG1 est un cofacteur facilitant l'expression de $\text{Na}_v1.5$ à la membrane. Récemment le mutant E83D a été identifié chez un patient ayant fait une fibrillation ventriculaire avec un ECG évocateur de SBr. Ce mutant est capable d'exercer un effet dominant négatif sur MOG1 sauvage et altère le transport du canal $\text{Na}_v1.5$ à la membrane [206, 207].

A.5/ L'alpha-actinine-2

Les quatre α -actinines appartiennent à la super famille des protéines de liaison de la F-actine incluant la spectrine et la dystrophine. Elles permettent la liaison de protéines avec le cytosquelette d'actine et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, parmi lesquels la liaison de protéines transmembranaires avec le réseau de filaments d'actine. Ces protéines possèdent une région N-terminale capable de lier l'actine, et un domaine central spectrine capable de se lier à différentes protéines telles que $\text{Na}_v1.5$. En effet, par la technique du double hybride puis du GST pull-down, Ziane et coll. ont montré que les domaines spectrine de l' α -actinine-2 se fixeraient à la boucle entre les domaines III et IV du canal $\text{Na}_v1.5$ (Figure 22). Ces deux protéines colocalisent aux tubules-T et aux stries-Z dans les cardiomyocytes ventriculaires chez l'Homme. L' α -actinine-2 augmente la densité de courant dans un système d'expression hétérologue par augmentation du nombre de canaux à la membrane. En revanche, aucun paramètre biophysique du canal ne semble être affecté [208]. Enfin, l' α -actinine-2 a été impliquée dans la cardiomyopathie dilatée et il ne serait pas étonnant qu'elle puisse jouer un rôle arythmogène dans d'autres pathologies cardiaques.

B/ Les Enzymes

B.1/ L'ubiquitine ligase Nedd4

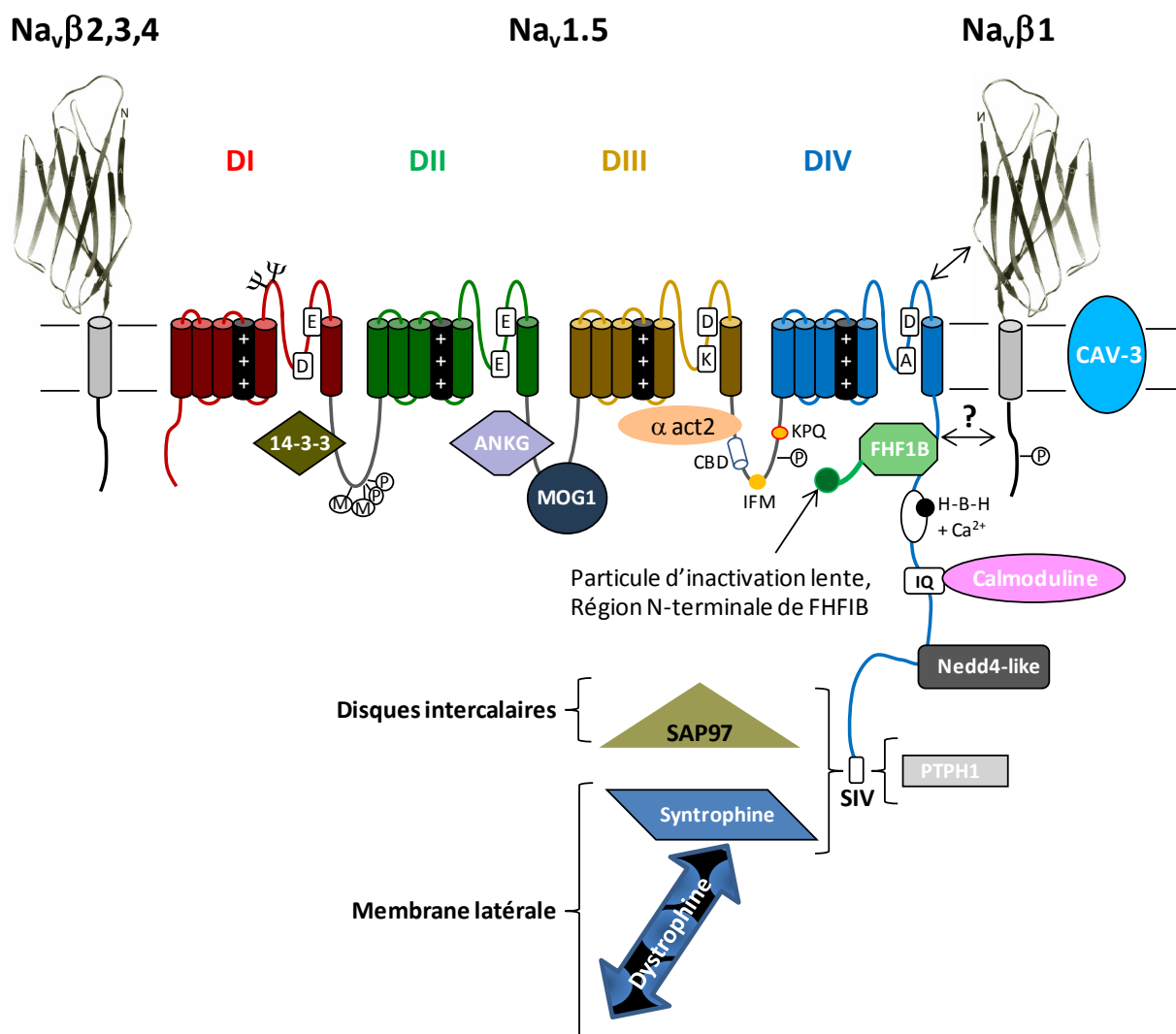
Il y a au moins huit isoformes de Nedd4-like exprimées dans le tissu cardiaque humain [209]. Ces protéines de la famille des ubiquitines ligases se lient spécifiquement aux protéines cibles possédant des motifs consensus PY, proline tyrosine, contenant la séquence [L/P]PxY [210]. De tels motifs sont retrouvés dans la partie C-terminale de la plupart des canaux sodiques dépendants du potentiel, à l'exception de $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.9$, et Na_x [211, 212], tout comme dans d'autres canaux ioniques cardiaques. Le rôle de ces protéines est de fixer une ou plusieurs protéines d'ubiquitine (8KDa) sur certaines lysines cibles de la protéine substrat. Ces modifications biochimiques post-traductionnelles ont plusieurs fonctions dont la plus connue est la dégradation de la protéine ubiquitinée par la sous-unité 26S du protéasome. Néanmoins, la fixation d'une courte chaîne

d'ubiquitine et la mono-ubiquitination interviennent dans de nombreux mécanismes cellulaires, la régulation du trafic et de la signalisation intracellulaire [213].

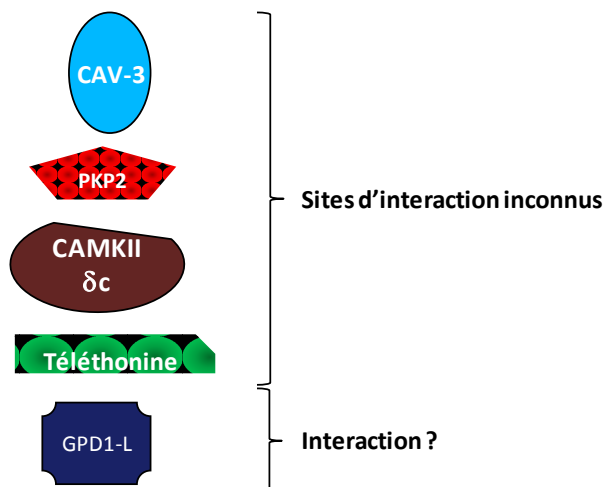
Il a été montré que Nedd4-2 se lie directement au site consensus PY de $\text{Na}_v1.5$ et ubiquitine le canal dans des cellules de mammifères (Figure 22) [131]. Néanmoins, le canal sodique ne serait pas dégradé mais soumis à une internalisation [211]. Par ailleurs, une autre étude montre qu'une augmentation de l'expression du canal $\text{Na}_v1.5$ inhibe le protéasome dans les cardiomyocytes de rats néonataux [214]. Enfin, une fraction de canaux $\text{Na}_v1.5$ ubiquitinés sont présents dans les tissus cardiaques suggérant que le recyclage et la stabilité de ce canal sont régulés *in vivo* par l'ubiquitination.

B.2/ La CAMKII

La protéine kinase II dépendante de la calmoduline et du Ca^{2+} (CAMKII) est une sérine thréonine kinase qui est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Cette protéine, lors de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire phosphoryle plusieurs protéines incluant les canaux ioniques cardiaques [215, 216]. La CAMKII est majoritaire dans le tissu cardiaque et l'isoforme CAMKII δ c est surexprimée chez l'Homme et chez les animaux en cas d'une insuffisance cardiaque [216, 217]. La CAMKII δ c colocalise et coimmunoprécipite avec $\text{Na}_v1.5$ dans le tissu cardiaque. Elle serait responsable de la phosphorylation du canal [218, 219], cependant le site d'interaction n'a pas encore été identifié (Figure 22). La surexpression de CAMKII δ c dans les cardiomyocytes de lapin ou chez des souris transgéniques induit un décalage hyperpolarisant de la courbe d'inactivation dépendante du potentiel, ralentit le retour à un état activable du canal et augmente le courant sodique persistant. Ces altérations des propriétés biophysiques du canal sont similaires à celles retrouvées dans la pathologie du SQTl congénital de type 3 [220]. Chez les souris transgéniques, la surexpression de la CAMKII δ c provoque une insuffisance cardiaque chronique et des épisodes de tachycardies ventriculaires. Dans les cardiomyocytes de chien, il a aussi été montré que l'activité de la CAMKII augmentait le courant sodique persistant I_{Na} [221]. Il n'est pas encore clair si les arythmies observées chez la souris sont dues à des altérations des propriétés biophysiques de $\text{Na}_v1.5$ ou à d'autres mécanismes associés à l'insuffisance cardiaque. Néanmoins, la CAMKII joue très probablement un rôle important dans la pathogenèse des arythmies cardiaques et constitue une cible potentielle pour de nouvelles drogues [215].

Figure 22 : Les partenaires de Na_v1.5

Localisation des différents partenaires de Na_v1.5. On notera que SAP97 interagit avec les canaux sodiques des disques intercalaires, alors que le complexe syntrophine-dystrophine interagit avec les canaux sodiques présents à la membrane latérale. Le « couple » calmoduline/Ca²⁺ est capable de se lier au site de liaison CBD (Calmodulin Binding Domain) situé dans la boucle d'inactivation intracellulaire liant les domaines DIII et DIV. La partie N-terminale de FHF1B constitue la particule d'inactivation lente du canal.



B.3/ La protéine Tyrosine Phosphatase PTPH1

Plusieurs canaux ioniques sont régulés par la phosphorylation de résidus tyrosine, un processus dépendant de tyrosine kinases et de phosphatases spécifiques [222]. Il a été montré que la surexpression de la protéine kinase Fyn dans des cellules HEK293 altère les propriétés biophysiques de $\text{Na}_v1.5$ en phosphorylant la tyrosine 1495 [124]. Cet acide aminé est proche du site IFM situé dans la boucle entre le domaines III et IV et impliqué dans l'inactivation rapide du canal [223]. Dans les cellules HEK293, la coexpression de Fyn avec $\text{Nav}1.5$ décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs et accélère le retour à l'état activable du canal sodique [124]. La phosphorylation de la tyrosine 1495 de $\text{Na}_v1.5$ a aussi été montrée dans des cellules cardiaques [124]. Néanmoins le site d'interaction de la Fyn kinase reste à identifier. Une étude récente montre que le domaine PDZ de la protéine tyrosine phosphatase I (PTPH1) s'associe au site SIV de $\text{Na}_v1.5$ [224], un site connu pour s'associer aussi avec la syntrophine et la SAP97 (Figure 22) [129]. Dans les cellules HEK293, la surexpression de PTPH1 décale la courbe de disponibilité des canaux $\text{Na}_v1.5$ sauvages vers des potentiels hyperpolarisés. Ce phénomène est abrogé lorsque le motif PDZ est muté. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ module la stabilité de son état inactivé. Il est intéressant de noter que plusieurs protéines (telles que : PTPH1, les syntrophines, ou la SAP97) peuvent interagir avec le même domaine de liaison, suggérant que différents complexes protéiques peuvent coexister dans les cellules cardiaques [129, 203, 224].

C/ Les protéines capables de modifier les propriétés biophysiques du canal

C.1/ La protéine 14-3-3 η

Les protéines 14-3-3 sont une famille de petites protéines cytosoliques adaptatrices formant des dimères [225]. Elles jouent entre autres, un rôle dans la régulation du transport d'un grand nombre de protéines membranaires [226]. Par des expériences de double hybride et de coimmunoprécipitation, il a été montré que 14-3-3 η interagissait avec la partie N-terminale de la boucle intracellulaire liant les domaines DI et DII du canal $\text{Na}_v1.5$ (Figure 22) [227]. De plus, il a été montré que 14-3-3 η et $\text{Na}_v1.5$ colocalisaient aux disques intercalaires. Des expériences de surexpression dans des cellules COS ont été réalisées mais aucune modification de la densité de courant sodique n'a été observée, suggérant que 14-3-3 η ne régulerait pas le transport à la membrane de $\text{Na}_v1.5$ ou qu'il nécessiterait un autre partenaire absent dans les cellules COS. Cependant, 14-3-3 η décale la courbe d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$ vers des potentiels plus négatifs et retarde le retour à l'état activable du canal, montrant que 14-3-3 η est capable de réguler les

propriétés biophysiques du canal. De nombreuses isoformes de 14-3-3 sont exprimées dans le cœur [227]; leurs rôles physiologiques associés ou non à la régulation de $\text{Na}_v1.5$ et leur possible implication en pathologie humaine devront être approfondis.

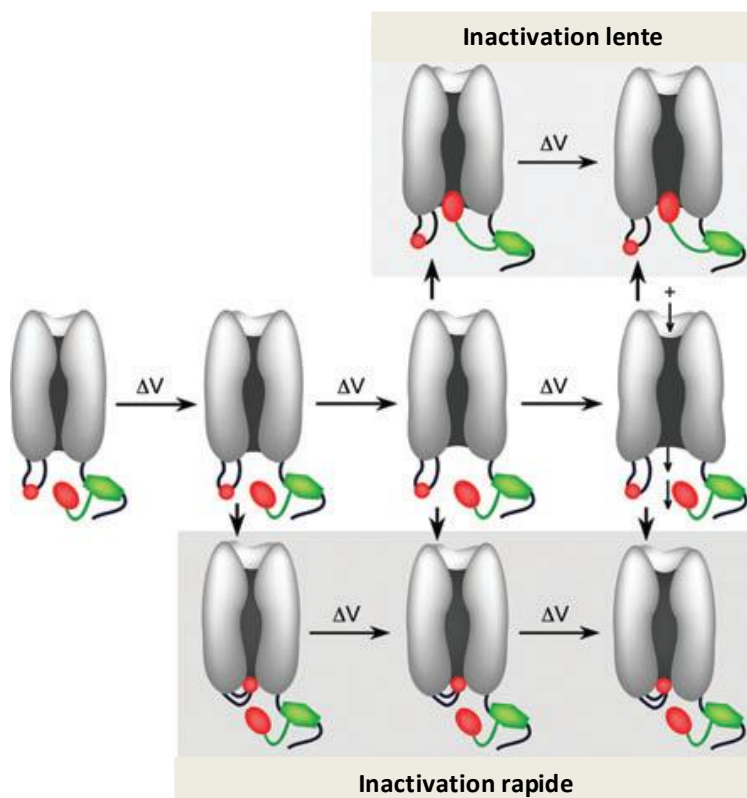
C.2/ La cavéoline-3 / SQT1 type 9

Les cavéolines forment des oligomères produisant d'étroites invaginations de la membrane plasmique appelées cavéoles qui sont riches en molécules de signalisation et en canaux ioniques [228]. La cavéoline-3, CAV3, est la principale isoforme exprimée dans le cœur et le muscle squelettique. Des mutations de la cavéoline 3 ont été rapportées associées à différents phénotypes cardiaques comme le SQT1 de type 9 [229], quelques cas de MSI [230], la cardiomyopathie hypertrophique [231], ou musculaires dans les dystrophies des ceintures [231]. La cavéoline 3 interagit avec de nombreuses protéines dont $\text{Na}_v1.5$ dans le tissu cardiaque de rat [232] et dans des cellules HEK293 surexprimant ces protéines [229]. Dans les cardiomyocytes les deux protéines colocalisent, particulièrement aux cavéoles [229, 232, 233]. Il a été suggéré que l'interaction avec $\text{Na}_v1.5$ puisse être indirecte *via* les protéines du complexe multi-protéique de la dystrophine (Figure 22) [129]. La coexpression dans des cellules HEK293, de $\text{Na}_v1.5$ et de CAV3 portant des mutations identifiées chez des patients atteints de SQT1 ou de MSI augmente le courant I_{Na} persistant [229, 230]. Ce résultat est en accord avec le phénotype observé chez les patients. Par ailleurs, il a été montré que la stimulation β -adrénergique par l'isoprotérénol provoque une rapide augmentation du courant sodique I_{Na} dans les cardiomyocytes de rat [232]. Ce phénomène serait indépendant de la protéine kinase A (PKA), car il a été montré qu'un inhibiteur de la PKA ne bloquait pas cet effet. Il est important de noter que cette rapide augmentation du courant sodique peut être mimée par stimulation de la sous-unité α de la protéine G, $G\alpha_s$, et est abolie par l'addition d'anticorps anti- $G\alpha_s$ ou anti-cavéoline-3 [232, 234]. Ces résultats suggèrent que la protéine $G\alpha_s$ et la cavéoline-3 agissent de façon coordonnée pour augmenter le courant I_{Na} *via* un mécanisme indépendant de l'AMPc. Les auteurs avancent l'idée qu'un réservoir de canaux $\text{Na}_v1.5$ puisse être localisé dans les invaginations des cavéoles où les protéines ne sont pas exposées au milieu extracellulaire du myocyte. Par une stimulation β -adrénergique, et *via* un mécanisme passant par la protéine $G\alpha_s$ et les cavéolines-3, les cavéoles pourraient s'ouvrir et permettre au canal d'être fonctionnel. Il a aussi été montré que l'histidine en position 41 de la protéine $G\alpha_s$ était nécessaire à l'augmentation du courant I_{Na} par la voie indépendante de l'AMPc [235]. Le mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel la protéine $G\alpha_s$ et la cavéoline-3 interagiraient, de façon directe ou indirecte (grâce à des protéines adaptatrices telles que la dystrophine et l'ankyrine qui sont présentes dans les cavéoles) avec le canal $\text{Na}_v1.5$ et augmente le courant sodique reste encore incompris.

Vatta et coll. ont identifié quatre mutations dans CAV3, T78M, A85T, F97C et S141R, chez des patients atteints de SQTL de type 9. Trois mutations sont localisées dans la partie transmembranaire, et S141R dans la partie C-terminale intracytoplasmique. La coexpression des mutants F97C et S141R avec le canal sodique cardiaque augmente le courant persistant [229]. Ces résultats sont en accord avec ceux des mutants $Na_v1.5$ impliqués dans le SQTL de type 3 [169]. En revanche, ces auteurs montrent aussi que ces deux mutants sont toujours capables d'interagir avec le canal, indiquant que le courant I_{Na} persistant n'est pas dû à une perte d'interaction entre les deux partenaires. Plus récemment, Cronk et coll. ont trouvé trois mutations dans CAV-3 chez des patients atteints de MSI : T78M, elle aussi retrouvée chez des patients atteints de SQTL de type 9, V14L, localisée dans la partie N-terminale, et L79R, située dans le segment transmembranaire [230]. De façon similaire aux mutations retrouvées dans le SQTL, la coexpression de ces trois mutants avec $Na_v1.5$ augmente le courant persistant I_{Na} .

C.3/ FHF1B ou FGF12-1b

Figure 23 : Mécanisme d'inactivation lente par FHF



Le corps de FHF (en vert) s'attache à la partie C-terminale de $Na_v1.5$. La balle d'inactivation IFM du canal (petit rond rouge) et la particule d'inactivation lente (grand ovale rouge) sont en compétition pour l'accès au site d'inactivation du canal.

Modifié de Dover et coll. J Physiol 2010

La protéine FHF1B, aussi appelée FGF12-1b, est exprimée dans le cœur [236]. Bien que les membres de la famille des FHF aient de fortes homologues de séquence et de structure avec les facteurs de croissance des fibroblastes, ce sont des protéines cytoplasmiques avec des fonctions spécifiques [237]. Ainsi, pour FHF1B, Liu et coll [238] ont montré qu'elle interagissait avec la partie C-terminale de $Na_v1.5$ (Figure 22). Goetz et coll. ont également rapporté que deux autres protéines FHF (FHF2A et FHF3A) seraient capables d'interagir avec la même partie de $Na_v1.5$ mais ces isoformes ne semblent pas être exprimées dans le cœur [239]. Dans les cellules HEK293, la coexpression de FHF1B avec $Na_v1.5$, décale la courbe d'inactivation vers des valeurs hyperpolarisées sans affecter d'autres paramètres étudiés [238].

De nombreuses mutations du canal $Na_v1.5$ associées au SQT ou au SBr sont situées dans cette région. La mutation D1790G [240] empêche l'interaction avec FHF1B et abolit le décalage de l'inactivation induit par cette dernière. Il a été proposé que cette protéine puisse faciliter l'interaction de protéines kinases [238]. Récemment, la partie N-terminale de FHF1B a été décrite comme pouvant être la particule d'inactivation lente des canaux sodiques (figure 23) [108]. Le corps de FHF s'attacherait à la partie C-terminale de $Na_v1.5$. La particule d'inactivation « IFM » du canal et celle constituée par la partie N-terminale de FHF seraient en compétition pour l'accès au site d'inactivation du canal. La particule d'inactivation de FHF1B est plus large que celle de $Na_v1.5$ et posséderait une surface d'interaction avec la partie intracellulaire de $Na_v1.5$ plus importante lui conférant une meilleure stabilité. Ainsi, lors de la dépolarisation, la compétition entre les deux particules dicterait la fraction de canaux entrant dans un état d'inactivation lent [108]. La modulation complexe de l'inactivation par cette particule de FHF1B nécessitera des expériences complémentaires.

C.4/ La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine intracellulaire ubiquitaire, capable de lier le Ca^{2+} . Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires [241] et plusieurs canaux cardiaques utilisent la CaM comme leur partenaire « sensible » au calcium [242, 243]. La partie C-terminale de $Na_v1.5$ possède un motif de liaison de la CaM conforme au motif « IQ » déjà décrit : IQxxxRxxxR (Tableau 3). Ce motif est retrouvé chez tous les membres de la famille des canaux Na_v [244]. Trois études [101, 245, 246] ont montré l'interaction de la CaM avec le motif IQ de $Na_v1.5$. Les conséquences fonctionnelles de ces interactions sont encore débattues, car les résultats obtenus sont difficiles à concilier (Chapitre III.C : Structure de la porte d'inactivation). Plusieurs groupes [100, 101, 246, 247] montrent que la dépendance et la stabilité de l'état inactivé sont dépendantes de la CaM et du motif

IQ. Plus récemment, il a été proposé que le site de fixation connu de la CaM ne serait pas l'unique région de régulation par le calcium dans $\text{Na}_v1.5$. La partie proximale de la partie C-terminale de $\text{Na}_v1.5$ possède aussi une région similaire à un motif « EF-hand » connu pour lier le calcium [99, 248]. Cependant ces résultats sont eux aussi discutés [103, 249]. De récentes études montrent que l'augmentation du calcium intracellulaire diminue la conductance du canal sodique lorsqu'il est étudié en canal unitaire [250]. Le calcium intracellulaire est un élément important dans la régulation de l'activité du canal, mais des études complémentaires seront nécessaires pour en comprendre les mécanismes exacts.

C.5/ La protéine GPD1L / syndrome de Brugada de type 2

La protéine glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1-like, inconnue jusqu'à récemment, codée par le gène *GPD1L*, possède 84% d'homologie avec la GPD1, la glycérol 3-phosphate déshydrogénase 1, une enzyme cytoplasmique qui catalyse la déshydrogénation du glycérol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) dans la voie glycolytique, puis la réduction de DHAP en G3P dans la synthèse des triglycérides [24, 251]. La GPD1L est exprimée de façon abondante dans le tissu cardiaque [24]. London et coll. ont identifié en 2002 un nouveau locus sur le chromosome 3 en 3p22-24 [252] dans une grande famille atteinte du syndrome de Brugada, pour laquelle le gène *SCN5A* avait été exclu. En 2007, ils ont trouvé qu'une mutation faux sens dans le gène codant *GPD1L*, A280V, coségrégait avec la maladie [253]. La coexpression du mutant GPD1L avec le canal sodique dans les cellules HEK293 diminue le courant sodique comparée à la coexpression avec la GPD1L sauvage et diminue le niveau d'expression de $\text{Na}_v1.5$ à la membrane. Trois autres mutations, E83K, I124V et R273C, ont été identifiées suite au séquençage de ce gène dans une cohorte de patients décédés subitement durant leur enfance de MSI [254]. L'expression de ces variants dans des cardiomyocytes de souris diminue le courant sodique, suggérant que le courant sodique chez ces patients MSI et chez les patients SBr est diminué. Ainsi, la GPD1-L jouerait un rôle dans le transport intracellulaire de $\text{Na}_v1.5$ [133, 251, 253, 254].

Récemment, Valdivia et coll. ont démontré que dans des cellules HEK293, GPD1-L catalyse aussi la réaction de G3P en DHAP, tout comme GPD1 et que les mutations A280V et E83K entraînent une diminution de l'activité enzymatique de GPD1-L [133]. Par la suite, ils ont montré que la diminution de l'activité de cette enzyme était liée à une augmentation de la phosphorylation du résidu S1503 de $\text{Na}_v1.5$. Cette phosphorylation est connue pour diminuer le courant I_{Na} [255]. Les auteurs émettent l'hypothèse que la perte de fonction de la GPD1-L augmenterait son substrat G3P, ce qui activerait la protéine kinase-C à l'origine de la phosphorylation de $\text{Na}_v1.5$. En effet, des expériences dans

lesquelles l'activité de la PKC est stimulée par la G3P, ou inhibée par la staurosporine, indiquent que la phosphorylation de $\text{Na}_v1.5$ et la décroissance du courant sodique qui en découle, passent par la voie PKC dépendante de G3P [133]. Bien que ce modèle soit intéressant, de plus amples études seront nécessaires pour confirmer ces résultats dans un environnement plus proche des cardiomyocytes. Enfin, il est important de noter qu'en utilisant la technique du « GST pull-down », Valdivia et coll. ont montré que l'interaction entre GPD1-L et le canal $\text{Na}_v1.5$ n'est pas altérée par les mutations de GPD1-L. Cependant, ils n'ont pas déterminé le site exact de l'interaction et si cette interaction était directe ou indirecte liée par des protéines capables d'interagir avec le canal (Figure 22) [24, 133].

C.6/ La téléthonine

La téléthonine est une petite protéine de 19KD, exprimée dans les cellules des muscles striés. Des mutations dans le gène de la téléthonine, *TCAP*, sont responsables de cardiomyopathies dilatées hypertrophiques et de dystrophies musculaires des ceintures [256, 257]. Cette protéine est connue pour interagir avec une protéine sarcomérique, la titine [258] et avec la sous-unité β du canal $\text{K}_v\text{LQT1}$, MinK codé par le gène *KCNE1*, responsable du courant I_{Ks} [259]. La téléthonine coimmunoprécipite et est colocalisée avec le canal $\text{Na}_v1.5$ dans le cœur. Néanmoins les sites d'interaction de ces deux protéines ne sont pas connus (Figure 22) [260]. Lorsque l'expression de la téléthonine est inhibée, l'activation dépendante du potentiel de $\text{Na}_v1.5$ est décalée vers des différences de potentiel plus positives. De plus, la coexpression de la téléthonine et de $\text{Na}_v1.5$ dans des cellules HEK293 altère plusieurs paramètres biophysiques du canal [260]. Cependant le rôle de la téléthonine dans le cœur et dans d'autres tissus reste encore à déterminer.

C.7/ La plakophiline-2

La plakophiline-2 est une petite protéine trouvée dans les desmosomes des disques intercalaires des cellules cardiaques. Elle est mutée chez certains patients atteints de cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène [261]. Il a été montré par des expériences de « pull-down » et de coimmunoprécipitation que cette protéine interagirait avec $\text{Na}_v1.5$ [262]. Cependant le site d'interaction directe ou indirecte reste inconnu (Figure 22). Ces deux protéines colocalisent aux disques intercalaires, et la suppression de la plakophiline-2 dans les cardiomyocytes réduit le courant sodique et altère certaines de ses propriétés biophysiques. La plakophiline 2 interagit aussi avec la connexine-43 [263], la protéine majeure des jonctions communicantes (gap-junction) des cellules cardiaques, suggérant que le canal $\text{Na}_v1.5$ et ces deux protéines des disques intercalaires pourraient être localisés dans un environnement très proche. A ce jour, il n'a pas été encore démontré que les

nombreuses mutations de la plakophiline-2 codée par le gène *PKP2* altéraient le courant sodique et que ces altérations du courant sodique participaient au développement des arythmies chez ces patients.

D/ Conclusions sur les partenaires et perspectives

Le canal sodique cardiaque est impliqué dans de nombreux troubles électriques cardiaques, menant au concept de « maladie de *SCN5A* » [264]. Il n'est néanmoins pas surprenant que des gènes codant pour des protéines capables de réguler la fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ soient eux aussi mutés chez des patients ayant des phénotypes similaires à ceux des patients ayant des mutations dans le gène *SCN5A* lui-même. Nous avons passé en revue les différents partenaires du canal déjà connus, en particulier ceux déjà impliqués dans des arythmies, néanmoins, ceux qui ne sont pas encore impliqués restent des candidats de premier ordre pour ces pathologies. Une autre idée émerge de toutes ces études, celle que $\text{Na}_v1.5$ pourrait être la partie centrale de plusieurs complexes multi-protéiques différents correspondant à des compartiments cellulaires différents ou des situations physiologiques variables. Les études de protéomique montrent que la liste de partenaires du canal sodique pourrait s'accroître. Ainsi, il est vraisemblable que plusieurs « pools » de canaux $\text{Na}_v1.5$ soient présents dans différents compartiments cellulaires [265]. Ces pools de canaux pourraient donc être régulés différemment, auraient des fonctions différentes, selon s'ils sont localisés à la membrane latérale, ou aux disques intercalaires. Cela pourrait expliquer qu'un même site d'interaction « SIV » du canal puisse interagir avec le motif de différents partenaires : la syntrophine, PTPH1, ou SAP97 *in vivo* (Figure 18). Il est intéressant de noter que de telles observations ont été faites pour le canal chlore CFTR [266], qui est capable de se lier aux domaines PDZ de différentes protéines, celles-ci associées à des fonctions différentes. La meilleure connaissance des fonctions des différents complexes protéiques $\text{Na}_v1.5$ permettra certainement de mieux comprendre la diversité des phénotypes liés à *SCN5A* dans les maladies cardiaques.

VI. Objectifs du travail de thèse :

Les études fonctionnelles et la résolution cristallographique du canal sodique bactérien [45] ont mis en évidence que chacun des segments transmembranaires, des boucles, des régions N- et C-terminales jouaient un rôle important pour le fonctionnement et l'assemblage du complexe du canal sodique cardiaque. Ils interviennent dans le changement de conformation du canal lors de la dépolarisation et de la repolarisation, dans son transport jusqu'à la membrane, ou même pour cibler la région du sarcolemme où il est adressé. Ces fonctions biologiques sont possibles grâce à des structures conservées au cours de l'évolution. Ainsi, les trois cents mutations du canal sodique identifiées dans diverses arythmies témoignent que le moindre changement de conformation ou de

séquence peut avoir des conséquences biologiques importantes [21]. Les modifications post-traductionnelles, encore peu étudiées, et les nombreux partenaires protéiques, connus et encore à découvrir, contribuent à la complexité du fonctionnement de ce canal.

La région N-terminale fait partie de ces régions conservées au cours de l'évolution dans lesquelles des mutations semblent être la cause de pathologies du système nerveux comme l'ataxie, l'épilepsie et l'érythermalgie, ou cardiaques comme le SQT et le SBr. Peu de mutations de cette région ont été caractérisées, mais elles semblent avoir un effet important sur la fonction du canal. Par exemple, les mutations R121W de $Na_v1.5$ et S21P de $Na_v1.6$ abolissent le courant sodique et les canaux mutants semblent être dans un cas, dégradés, et dans l'autre, retenus dans l'appareil de Golgi. De plus, trois études montrent que cette région du canal pourrait intervenir dans l'activation dépendante du potentiel des canaux $Na_v1.X$. Le canal Q10R- $Na_v1.7$ entraîne une hyperexcitabilité des neurones des ganglions de la racine dorsale due à un décalage hyperpolarisant de la courbe d'activation [113]. Le variant R43Q- $Na_v1.5$ induit un décalage hyperpolarisant de l'activation, mais seulement en présence de lidocaïne [110]. La région N-terminale des canaux sodiques $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$ serait responsable de leur seuil d'activation respectif [114]. Enfin, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'il existe un partenaire de $Na_v1.5$ capable de se lier à cette région, comme cela a été montré pour $Na_v1.8$ avec l'annexine 2, qui participerait à l'expression du canal à la membrane plasmique [116-119].

Par ailleurs, la région C-terminale est une région importante pour la fonction du canal. En effet, de nombreux partenaires interagissent avec cette région et jouent un rôle dans son transport à la membrane et dans son inactivation dépendante du potentiel [3, 99].

Ce travail de thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle de la région N-terminale du canal sodique cardiaque, en s'appuyant sur l'étude de différentes mutations menant à la perte totale de fonction du canal sodique. La mutation R104W a été identifiée chez un patient atteint de SBr. Cette arginine 104 est située dans un motif très conservé au cours de l'évolution et présent dans toute la famille des canaux $Na_v1.X$. Ceci suggère que cette région pourrait avoir un rôle similaire parmi différents canaux de la famille des canaux sodiques dépendants du potentiel. L'objectif est de tenter de répondre aux questions suivantes. Comment cette mutation de la région N-terminale du canal sodique cardiaque peut-elle induire une perte de fonction menant à la pathologie ? Quelle est le rôle de cette région dans la fonction du canal ? Est-elle nécessaire à sa fonction et/ou à son transport à la membrane ?

De plus, nous nous sommes intéressés à une mutation tronquante située dans la région C-terminale du canal sodique cardiaque, R1860fsX12, identifiée chez une famille atteinte de dysfonction sinusale sévère symptomatique sans l'élévation du segment ST évocatrice du SBr, ni d'arythmie ventriculaire comme c'est le plus souvent le cas pour les mutations associées à une perte de fonction du canal $Na_v1.5$. Les questions posées sont : comment cette mutation affecte-t-elle le courant sodique, joue-t-elle un rôle dans l'inactivation du canal ? Pourquoi cette mutation n'induit-elle pas une élévation du segment ST chez ces patients ?

Résultats

I. Etude fonctionnelle de mutations de la partie N-terminale du canal sodique Na_v1.5

A/ Résumé de l'article soumis pour publication : "Dominant-negative suppression of the cardiac sodium channel by N-terminal mutations"

A.1/ Introduction :

La mutation R104W est située dans la partie N-terminale du canal sodique cardiaque. Elle a été identifiée chez un patient asymptomatique dont l'ECG présentait des anomalies caractéristiques du syndrome de Brugada, à savoir une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites. Son père, qui avait un ECG similaire, est mort subitement durant son sommeil à l'âge de 61 ans. Ceci a conduit à la décision d'implanter un défibrillateur au proposant bien qu'il soit asymptomatique.

Nous nous sommes intéressés à l'analyse fonctionnelle de cette mutation, ainsi qu'à d'autres mutations déjà répertoriées dans la littérature dans le but d'étudier le rôle de la partie N-terminale de Na_v1.5 sur la fonction, la localisation subcellulaire, ou encore l'expression protéique du canal sodique. Les analyses du courant sodique ont été réalisées grâce à la technique du patch clamp sur cellule entière, par expression hétérologue des canaux sodiques dans des cellules HEK293. L'expression protéique a été mesurée par western blot et biotinylation dans ce système. La localisation subcellulaire des différents canaux a été réalisée dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés transfectés afin de se rapprocher d'un système d'expression physiologique, possédant entre autres les protéines cardiaques potentiellement partenaires de Na_v1.5. Nous avons comme objectif de caractériser les propriétés biophysiques du canal muté.

A.2/ Résultats :

La première étape de notre étude a été de caractériser le courant sodique du canal mutant R104W. Dans notre modèle, la mutation abolit le courant sodique. Ni la cotransfection du canal et de la sous-unité Na_vβ1, ni la mise en culture des cellules à 30°C durant 24h, ni l'ajout de différentes concentrations de mexiletine (un anti-arythmique de classe IB qui permet parfois de faciliter le transport à la membrane et le repliement de certaines protéines mutantes). N'ont permis de

restaurer le courant sodique. L'insertion d'une mutation R104K mimant la charge positive de l'arginine, a permis de restaurer un faible courant (12% de celui du canal sauvage), néanmoins, la courbe d'activation était décalée de +8.6mV. Par la suite, la coexpression du canal mutant R104W et du canal sauvage pour mimer l'état hétérozygote du patient a montré un effet dominant négatif impliquant une perte de courant sodique de 80% par rapport au canal sauvage exprimé seul. Nous avons aussi observé un décalage de +8.5mV de la courbe d'activation vers des potentiels positifs. Afin de comparer ces résultats avec ceux d'autres mutations étudiées précédemment, nous avons exprimé les mutations R121W, G1743R et R878C abolissant le courant par différents mécanismes. La mutation R121W, qui affecte aussi la partie N-terminale, a été rapportée comme associée à une dégradation de la protéine mutée après transfection [39] alors que la protéine mutée G1743R, localisée dans la partie distale de la boucle liant les segments S5 et S6 du domaine IV, est retenue dans des compartiments intracellulaires [267]. Enfin, le canal mutant R878C est capable d'atteindre la membrane mais incapable de s'ouvrir [38, 268]. De façon surprenante, la coexpression des mutants R121W et G1743R avec le canal sauvage a révélé, d'une part, un décalage du $V_{1/2}$ de la courbe d'activation vers des potentiels positifs, et d'autre part, un effet dominant négatif. Seul le mutant R878C capable d'atteindre la membrane ne présente pas d'effet dominant négatif sur le courant sodique. A cette étape de l'étude, nous suspectons que les canaux mutants R104W ne pouvaient pas atteindre la membrane plasmique.

La deuxième étape de notre étude a été de comprendre les mécanismes sous-jacents à la perte de fonction totale des mutations N-terminales R104W et R121W. L'étude de la localisation des canaux mutants dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés a montré qu'ils étaient retenus dans le réticulum endoplasmique, tout comme le mutant G1743R. De plus, la quantification par western blot a montré que la quantité des canaux R121W et R104W- $\text{Na}_v1.5$ était réduite de plus de 50% comparée à celles du canal sauvage ou du mutant R878C. L'incubation des cellules avec un inhibiteur de la sous-unité 26S du système ubiquitine-protéasome, le MG132, a inhibé ce phénomène. Ainsi, la perte de fonction des canaux mutants, R104W et R121W, semblait être due à leur rétention dans le réticulum endoplasmique précédant leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Néanmoins, ce phénomène n'expliquait pas l'effet dominant négatif observé ainsi que le décalage de la courbe d'activation vers des valeurs positives.

La troisième étape de notre travail a eu pour but de comprendre le mécanisme pouvant expliquer l'effet dominant négatif des mutants retenus dans le réticulum endoplasmique puis dégradés, et le décalage de la courbe d'activation. Pour ce faire, nous avons étudié la localisation subcellulaire du canal sauvage et du canal mutant R104W dans des cardiomyocytes de rats nouveau-

nés après coexpression du canal mutant et du canal sauvage, chacun fusionné à un épitope différent (GFP ou FLAG). Le canal sauvage en présence du mutant est apparu, lui aussi, être retenu dans des compartiments intracellulaires. La coexpression des deux canaux dans des cellules HEK293 et l'étude des canaux présents à la membrane ont montré que le canal sauvage en présence du mutant était retenu mais n'était pas soumis à une dégradation accrue. Ces résultats suggèrent que les canaux mutants retenus à l'intérieur de la cellule pourraient avoir la capacité d'inhiber le transport du canal sauvage à la membrane. Ce phénomène pourrait expliquer l'effet dominant négatif et soutient l'hypothèse que les sous-unités α des canaux sodiques seraient capables d'interagir de façon directe ou indirecte dès le réticulum endoplasmique.

Enfin, nous avons fait l'hypothèse que si un canal mutant était capable d'inhiber le transport à la membrane du canal sauvage, ce dernier pouvait quant-à lui permettre le transport d'une petite partie de ces mutants jusqu'à la surface de la cellule. Aussi, nous avons utilisé le mutant R878C (capable d'atteindre la membrane, mais incapable de s'ouvrir) comme outil pour vérifier cette hypothèse. La coexpression du mutant R878C avec les mutants R104W, R121W et G1743R restaure un courant sodique de faible amplitude (entre 2 et 8% du courant sauvage). De plus, les courants restaurés présentent un décalage de la $V_{1/2}$ de la courbe d'activation près de deux fois plus important que ceux mesurés dans le cas de la coexpression avec le canal sauvage. Ceci suggère que les canaux mutants restaurés et présents à la membrane seraient capables d'altérer l'activation dépendante du potentiel des canaux sauvages. Ces derniers résultats semblent bien montrer la capacité des canaux sodiques à coopérer non seulement lors de leur transport vers la membrane, mais aussi dans leur capacité d'ouverture dépendante du potentiel.

A.3/ Conclusion :

Nos résultats suggèrent que la partie N-terminale de la protéine jouerait un rôle important dans le transport du canal sodique cardiaque à la membrane ainsi que dans l'activation dépendante du potentiel. De plus, l'effet dominant négatif exercé sur le canal sauvage par des mutants retenus dans le réticulum endoplasmique, ainsi que la capacité du mutant R878C à restaurer une petite partie de ces mutants à la surface de la cellule, suggèrent un mécanisme d'interaction des canaux sodiques dans le réticulum endoplasmique. Enfin, les décalages des courbes d'activation vers des potentiels positifs mesurés dans des cellules exprimant les canaux sauvages et mutés et l'amplification de ce décalage en remplaçant le canal sauvage par le mutant R878C, suggèrent fortement que les canaux mutants seraient capables d'altérer l'activation du canal sauvage.

A.4/ Article :**Dominant-negative suppression of the cardiac sodium channel Nav1.5 by N-terminal mutations****Clatot - Dominant-negative suppression of Nav1.5**

Jérôme Clatot^{1,2}, MSc, Azza Ziyadeh-Isleem^{1,2}, MD, Svetlana Maugrenre^{1,2}, BS, Isabelle Denjoy^{1,2,3}, MD, Gilles Dilanian^{1,2}, BS, Stéphane N Hatem^{1,2}, MD, PhD, Alain Coulombe^{1,2}, PhD, Pascale Guicheney^{1,2*}, PharmD, PhD, Nathalie Neyroud^{1,2*}, PhD

*Both authors contributed equally to this work.

¹ INSERM, UMR_S 956, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR_S 956, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Hôpital Bichat, Centre de Référence des Maladies Cardiaques Héritaires, F-75018, Paris, France

Correspondence to:

Nathalie Neyroud, PhD

Inserm UMRS 956, Université Pierre & Marie Curie Paris 6

91, boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

Phone: (33) 1 40 77 96 49

Fax: (33) 1 40 77 96 45

Email: nathalie.neyroud@upmc.fr

6937 words

[89] Genetics of cardiovascular disease

[106] Electrophysiology

[152] Ion channels/membrane transport

Abstract

Rationale: Brugada syndrome (BrS) is an autosomal inherited cardiac arrhythmia characterized by ST-segment elevation in the right precordial leads of the electrocardiogram, and an increased risk of syncope and sudden death. *SCN5A*, encoding the cardiac sodium channel $Na_v1.5$, is the main gene involved in BrS. Despite several mutations have been reported in the $Na_v1.5$ N-terminus, the functional role of this region remains unknown.

Objective: The aim of this study was to characterize two BrS mutations, R104W and R121W, affecting evolutionarily conserved residues in the N-terminal cytoplasmic region of $Na_v1.5$.

Methods and Results: Patch clamp recordings in HEK293 cells demonstrated that R104W and R121W mutations drastically reduced I_{Na} , exerted a strong dominant-negative effect on wild type (WT) channels, and shifted the WT channel $V_{1/2}$ of activation towards positive potentials. Immunocytochemistry of rat neonatal cardiomyocytes revealed that both mutants were mostly retained in the ER. Moreover, their co-expression with WT channels led to WT channel retention in intracellular compartments, deciphering their dominant-negative effect. Both mutants were degraded by the ubiquitin-proteasome system. Finally, when co-expressed with the gating-defective but trafficking-competent R878C $Na_v1.5$ mutant, R104W and R121W were then able to generate a small I_{Na} exhibiting a positive shift in the $V_{1/2}$ of activation.

Conclusions: This is the first report of *SCN5A* mutations inducing dominant-negative effect, shift in activation and protein degradation. Our study suggests that the $Na_v1.5$ N-terminus plays a critical role in the channel activation and expression at the plasma membrane, and that dominant-negative mutants in $Na_v1.5$ can be rescued by transcomplementation.

Keywords

Brugada Syndrome / Dominant-negative effect / $Na_v1.5$ / *SCN5A* / Transcomplementation

Non-standard Abbreviations and Acronyms

BrS: Brugada syndrome

ECG: electrocardiogram

WT: wild type

ER: endoplasmic reticulum

eGFP: enhanced green fluorescent protein

PBS: phosphate buffer saline

RBBB: right bundle branch block

ICD: implantable cardiac defibrillator

UPR: unfolded protein response

ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation

COPI: coated protein complex I

RNC: rat neonatal cardiomyocyte

Introduction

Brugada Syndrome (BrS) is an inherited autosomal dominant cardiac channelopathy with incomplete penetrance. It is characterized by a structurally normal heart with a typical electrocardiographic (ECG) pattern showing ST-segment elevation in the right precordial leads (V1-V3), complete or incomplete right bundle branch block, and an increased risk of sudden cardiac death as a result of ventricular fibrillation¹. Mutations in *SCN5A*, the gene encoding the cardiac voltage-gated sodium channel Na_v1.5, have been identified in approximately 25% of affected individuals², and commonly reveal loss-of-function properties markedly reducing the sodium current I_{Na} due either to gating abnormalities, trafficking defects, or to premature stop codons leading to haploinsufficiency^{3,4}.

Ion channels form macromolecular complexes with other transmembrane subunits and intracellular partners that participate in the regulation of channel expression and function⁵. Na_v1.5 constitutes the α -subunit of the cardiac Na⁺ channel complex and is not known to oligomerize with other α -subunits. Nevertheless, a dominant-negative effect of a mutant channel on wild type (WT) Na_v1.5 has been reported previously⁶. Moreover, the common polymorphism H558R in Na_v1.5 has been shown to partially restore I_{Na} impaired by nearby mutations, even when the polymorphism and the mutation are located on two different alleles^{7,8}. These data suggest cooperation between Na_v1.5 α -subunits, of which the mechanism remains to be elucidated.

To date, several mutations have been identified in the N-terminus of Na_v1.5 in patients with BrS or Long QT syndrome, but their functional consequences on I_{Na} have not been studied *in vitro*, except for two of them. The R121W mutant was reported in conduction disease and associated with degradation and loss of channel function, and the R43Q mutation showed a hyperpolarizing shift of the activation but only under lidocaine^{9, 10}. The role of the N-terminal region of Na_v1.5 on the trafficking, localization and regulation of channel function remains largely unknown. Using chimeric constructs of other members of the Na_v channel family, Na_v1.2 and Na_v1.6, it has been demonstrated that their N-terminus plays a role in voltage-dependent activation¹¹.

In this study, we characterized the physiological and biophysical properties of two Na_v1.5 N-terminal mutations: R104W, identified in a BrS patient, and R121W which was previously reported⁹. Both mutant channels exerted a marked dominant-negative effect on I_{Na} by retention in the endoplasmic reticulum (ER) and subsequent degradation by the ubiquitin-proteasome system of mutant channels. Surprisingly, coexpression of N-terminal mutants with the trafficking-competent but gating-defective mutant R878C gave rise to a small I_{Na}. Altogether our results suggest that the N-

terminal region of Na_v1.5 plays a key role in the cardiac sodium channel function, and argue for cooperation of Na_v1.5 α -subunits.

Methods

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement.

Patient

The proband was diagnosed with BrS on the basis of a spontaneous type-1 ECG pattern on the 12 lead ECG (ST segment elevation ≥ 2 mm in one or more right precordial leads) and family history according to the consensus report¹. Blood samples were obtained after signed written informed consent for genetic analyses. The study was conducted according to the principles of the Helsinki Declaration.

SCN5A mutation analysis

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes according to standard procedures. Screening for mutations in the SCN5A gene (GenBank accession number NG_008934.1) was performed by genomic DNA amplification of all exons and splice junctions. PCR products were directly sequenced with the Big Dye Terminator v.3.1 kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). Variants and mutations were identified by visual inspection of the sequence with Seqscape software (Applied Biosystems).

SCN5A cDNA cloning and mutagenesis

Plasmids pcDNA3.1-eGFP-SCN5A and pRcCMV-FLAG-SCN5A were the kind gifts of Dr H. Abriel (Bern, Switzerland) and Dr N. Makita (Nagasaki, Japan), respectively. In these constructs, the sequence encoding either the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) or the FLAG epitope (DYKDDDDK) was fused to the Na_v1.5 N-terminus sequence, to trace the trafficking of the channel in cardiomyocytes by microscopy, and to identify transfected cells for patch clamp recordings. Both plasmids contain the hH1a isoform of SCN5A. The plasmid pcDNA3-CD4-KKXX and the anti-CD4-KKXX antibody were the kind gifts of Dr J. Mérot (Nantes, France). This plasmid was designed to express CD4 carrying the KKXX motif of ER retention. Mutants R104W, R104K, R121W, G1743R and R878C in Na_v1.5 were prepared using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Inserts were subsequently sequenced to ensure that there were no other mutations.

HEK293 cell culture and transfection

HEK293 cells were cultured and transfected as detailed in the Online Data Supplement.

Solutions and drugs

Solutions for patch clamp recordings are described in the Online Data Supplement.

Electrophysiological recordings

Patch-clamp recordings were carried out in the whole-cell configuration at room temperature (20-25°C) as previously reported¹². See the Online Data Supplement for details.

Rat neonatal cardiomyocyte isolation and transfection

Rat neonatal cardiomyocytes (RNC) were isolated and grown for 24h as previously described¹³ before transfection. Following dissociation, cardiomyocytes were cultured overnight in a 1% CO₂ incubator before transfection with 600 ng of GFP fused constructs of WT or mutant Na_v1.5 using a liposomal approach (Lipofectamine 2000, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, cardiomyocytes were fixed for immunocytochemistry.

Immunocytochemistry

Immunostainings were performed on RNCs as described in the Online Data Supplement.

Imaging fluorescence

Labeled cardiomyocytes were observed with an Olympus epifluorescent microscope (60X). Images were acquired with a CoolSnap camera (Roper Scientific) and analyzed with Metamorph software (Molecular devices) equipped with a 3D-deconvolution module. For each sample, series of consecutive plans (stack of images) were acquired (sectioning step: 0.2 μm).

Protein extraction

Forty-eight hours after transfection with WT or mutant constructs, HEK293 cells were washed with PBS and lysed in Lysis Buffer (50 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate and complete protease inhibitor cocktail from Roche) for one hour at 4°C on a wheel. The soluble fractions from two subsequent 30-min centrifugations at 14,000 g (4°C) were then used for the experiments. In order to load each lane of the SDS-page with equivalent amounts of total protein, the protein concentration of each lysate was measured in duplicate by Bradford assay using a BSA standard curve.

Biotinylation assay

Forty-eight hours after transfection with WT or mutant constructs, HEK293 cells were biotinylated as detailed in the Online Data Supplement. Biotinylated proteins were then analyzed by Western blot.

Statistics and data analysis

Data are presented as means \pm SEM (Standard Error of the Mean). Statistical significance was estimated by a Student's t test or ANOVA, as appropriate. $P < 0.05$ was considered as significant. Statistical analyses were performed with SigmaPlot® software.

RNA extraction and reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

Forty-eight hours after transfection with WT or mutant channels, selected cells were treated with DTT 500 μ M for one hour to induce UPR as a positive control. Total RNA was extracted from DTT-treated and non-treated cells using TRIzol reagent with the PureLink mRNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA). One μ g of total mRNA was reverse-transcribed with the SuperScriptIII RT-PCR kit (Invitrogen, CA, USA). PCR was then performed as previously reported using primers XBP1-forward CCTTG TAGTTGAGAACCAGG and XBP1-reverse GGGGCTTGGTATATATGTGG¹⁴.

Results

Identification of a Na_v1.5 N-terminal mutation in a BrS patient

The proband (II.1) was an asymptomatic 33-year-old male with a spontaneous BrS type 1 ECG pattern, combining ST-segment elevation and inverted T waves in lead V1, and an incomplete right bundle branch block (RBBB) pattern (PR= 208 ms, QRS= 124 ms) (Figure 1). Echocardiography, myocardial scintigraphy and coronary angiography were performed, and showed small akinetic areas in the right ventricular infundibulum, healthy coronary arteries, and normal left ventricular function. Programmed electrical stimulation induced sustained ventricular tachycardia degenerating into ventricular fibrillation. As recommended at that time, the patient received an implantable cardiac defibrillator (ICD). No ICD discharge occurred during the seven years of follow-up. His father presented with similar ECG abnormalities (Figure 1) and died suddenly during sleep at the age of 61.

Subsequently, *SCN5A* was screened and a variant, c.310 C>T, was identified in exon 3 in the proband, which induces the substitution of the evolutionarily conserved basic arginine residue at position 104 by an aromatic tryptophan (p.R104W) (Figure 1). This variant was not found in 300 Caucasian controls and neither in the dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). It was not transmitted to the proband's healthy offspring and was considered to be a putative mutation responsible for BrS.

The R104W mutation abolished the Na⁺ current in HEK293 cells

To determine the consequences of the R104W mutation, Na⁺ current was recorded in HEK293 cells 36h after transfection with 0.6µg of WT or R104W Na_v1.5 constructs. Representative I_{Na} traces and I/V relationships are shown in Figures 2A and 2B. Peak current density and p values are given in Table 1. When the R104W mutant channel was expressed alone, no whole-cell current could be detected. We failed to restore any I_{Na} by co-expressing R104W with the Na⁺ channel b1 subunit or by decreasing the cell incubation temperature to 30°C, a condition known to increase protein folding¹⁵. In addition, incubation of the cells with various concentrations of a class I anti-arrhythmic agent, mexiletine, shown to partially rescue some misfolded mutant channels such as G1743R¹⁶, did not increase I_{Na}. The common polymorphism H558R is reported to rescue the effect of some trafficking-defect mutants⁷, however, when H558R was added to the R104W plasmid, it did not restore any Na⁺ current.

The alterations in Na⁺ channel function critically depended on the R104 residue

Arginine 104 is located in a fragment of the predicted intracellular N-terminal part of Na_v1.5 containing several positively charged arginine and lysine residues. This region is highly conserved

through evolution and within the Na_v -channel family (Figures 1B and 1C). To determine whether the absence of the positively charged nature of residue 104 is responsible for the loss of function of the R104W mutant, arginine 104 was replaced by another positive amino acid, lysine. Figures 2A and B show that transfection of R104K mutant into HEK293 cells gives rise to a very small I_{Na} of only 12% of the WT current (Table 1). This suggests that arginine 104 has a more specific role than simply providing a positive charge. Surprisingly, $V_{1/2}$ of the activation-voltage relationship was shifted by +8.6 mV (n=8), while the steady-state inactivation of R104K channel was unaffected (Table 1 and Figure 2C). This suggests that the N-terminal part of $\text{Na}_v1.5$ could play a role in the $\text{Na}_v1.5$ voltage dependence of activation.

In parallel, we tested the hypothesis that the loss of function due to R104W could be linked to a phosphorylation defect of serine 106, due to an alteration of the putative RXS phosphorylation motif, but transfection of the S106A mutant into HEK293 cells did not affect the Na^+ current.

R104W was mostly retained in the ER in rat neonatal cardiomyocytes

We labeled WT or R104W transfected RNCs with anti-GFP antibody to assess whether the mutant channel reached the cell surface membrane. R104W showed strong perinuclear and intracytoplasmic labeling, and seemed to be retained in intracellular compartments, which was clearly different to WT membrane localization (Figures 3A and 3D). At this point of our study, we chose to express other non-functional $\text{Na}_v1.5$ mutants due to either protein degradation, R121W⁹, or to trafficking defects, G1743R¹⁶, to compare them to R104W. Both R121W and G1743R were retained in intracellular compartments similar to R104W (Figures 3G and 3F). In RNCs, we stained specific sub-cellular compartment markers, such as: Giantin for the Golgi apparatus, LampI for lysosomes, and LC3 for proteasome, but none of the studied mutants localized to these compartments. By co-transfecting RNCs with $\text{Na}_v1.5$ mutants and CD4 carrying the KKXX motif of ER retention, we showed that the N-terminal mutants and G1743R were mostly retained in the ER (Figure 3).

As shown in supplemental Figure 1, WT channels expressed alone were mostly located at the plasma membrane in transfected RNCs, whereas, when co-expressed with R104W, WT channels co-localized with R104W and showed stronger ER labeling. These data suggest that R104W expression leads to WT channel retention, which may result in a dominant-negative effect of mutant on WT channels.

R104W, R121W and G1743R had a dominant-negative effect on WT channels

To mimic the heterozygous state of the BrS patient, we co-transfected HEK293 cells with the WT channel and each mutant channel in a 1:1 ratio. Interestingly, co-transfection of WT with R104W, R121W or G1743R drastically reduced peak current densities by approximately 80% of the WT

current density (Table 1 and Figure 2D). This dominant-negative effect was further confirmed by transfecting a HEK Na_v1.5 stable cell line with the three trafficking-defective channels (Supplemental Figure 2). We also co-expressed WT channels and R878C, a non-functional mutant with a gating defect but which traffics normally to the membrane^{17, 18} as a control, and we then observed a ≈50% reduction of the WT current density, as previously reported¹⁷ (Figure 2D).

Surprisingly, in cells co-expressing WT and either R104W, R121W, G1743R or R878C channels, the $V_{1/2}$ of activation-voltage relationship was significantly shifted to more positive potential values, a result which has not previously been reported (Figure 2E). No variation of the steady-state inactivation was observed in cells co-expressing R104W and WT channels compared to WT alone (Table 1).

N-terminal mutant channels were degraded, while WT channels were not

Western blots were performed with transfected HEK293-cell total lysates to assess the expression of N-terminal mutants. Figure 4A shows a significant decrease in total protein expression of R104W, R121W and R104K channels, when compared to WT or to R878C trafficking-competent mutant (reduced by 55%, 63% and 64% when compared to WT). Furthermore, incubating cells transfected with either R104W or R121W with the 26S-subunit ubiquitin-proteasome inhibitor, MG132, prevented this degradation (Figure 4B).

In order to test whether the R104W mutant could also cause the degradation of normal WT channels, we transfected cells with differentially tagged channels to distinguish the WT from mutant channels. Figure 4C shows that WT channels were not degraded in the presence of R104W. To assess whether the N-terminal mutants reached the plasma membrane, we performed cell surface protein biotinylation in transfected HEK293 cells, and showed a drastic reduction of R104W, R121W and R104K cell surface expression when compared to WT or to the trafficking-competent R878C mutant (Figure 4D). This was consistent with the mutant retention and degradation observed.

R104W, R121W and G1743R did not induce reticular stress

Accumulation of unfolded proteins in the ER can cause reticular stress, and activate signaling pathways including the unfolded protein response (UPR)¹⁹. UPR activation leads to the XBP-1 mRNA splicing of 26 nucleotides (S-XBP-1) causing a frameshift and the generation of a longer active protein. Analysis of these spliced transcripts is used as a marker of reticular stress¹⁴. We performed reverse transcription PCR on a pool of mRNA extracted from HEK293 cells transfected with the two N-terminal Na_v1.5 mutants. As shown in Figure 4E, only cells incubated with DTT, known to induce reticular stress and used as a positive control, contained S-XBP-1 mRNA, suggesting that the mutant Na_v1.5 channel transfection does not cause reticular stress by UPR activation.

Dominant-negative Na_v1.5 mutants were transcomplemented by R878C

In line with Na_v1.5 channel α -subunit cooperation suggested by the dominant-negative effect, we hypothesized it might be possible to rescue dominant-negative Na_v1.5 mutants by transcomplementation, using a trafficking-competent but non-functional Na_v1.5 mutant. In HEK293 cells we co-expressed either R104W, R121W or G1743R channels with R878C. Interestingly, while R104W, R121W and G1743R channels alone give nearly no current, their co-expression with R878C gave rise to small but measurable currents as illustrated in Figures 5A and 5B. These restored currents represented 2 to 8% of the WT current measured under the same experimental conditions. Moreover, the kinetic properties of rescued currents were impaired: $V_{1/2}$ of V_m -activation relationships of R878C+R121W and R878C+G1743R were shifted towards positive values compared to WT, and also compared to WT+R121W and WT+G1743R (Figure 5C). Activation of R878C+R104W was also likely shifted towards positive potential values as observed on the I/V relationships (Figure 5B), but V_m -activation relationship could not be reliably determined because of the small size of the currents. Interestingly, $V_{1/2}$ of V_m -activation relationship of G1743R rescued by mexiletine was significantly shifted towards positive potentials by +17mV compared to WT, and by +7mV compared to WT+G1743R (Figures 5D and 5E). Altogether, our results showed that mutant channels rescued either by transcomplementation or by mexiletine have impaired voltage-dependent activation.

Discussion

Our study highlights for the first time the important role of the cytoplasmic evolutionarily-conserved N-terminal domain of the cardiac Na⁺ channel Na_v1.5 α-subunit. We describe several novel findings by the analysis of two missense mutations, R104W and R121W. These mutants abolished I_{Na} due to retention in the endoplasmic reticulum and subsequent degradation. Interestingly, they also exerted a dominant negative effect on WT channels and impaired their voltage-dependent activation. In addition, we demonstrated the capacity of R878C, a trafficking-competent but gating defective mutant, to partially rescue mutant function, implying a mechanism of transcomplementation. Altogether, our data suggest direct or indirect cooperation between Na_v1.5 α-subunits.

We identified the missense Na_v1.5 mutation, R104W, in a 33-year old asymptomatic patient with a typical type 1 BrS ECG pattern, identical to that of his father, who had died suddenly during sleep. The mutation R121W has previously been reported in a BrS patient² and in a patient with sick sinus syndrome, cardiac conduction disease and atrial flutter⁹. In the latter publication, R121W was associated with a loss of channel function and protein degradation. These two positively charged arginine residues, as well as others located in the N-terminal cytoplasmic domain of Na_v1.5, are very well conserved throughout evolution among the whole family of Na⁺ channels in vertebrates. Their substitution by a tryptophan abolished I_{Na} in transfected HEK293 cells. Interestingly, similar substitutions in the N-terminal part of Na_v1.1; R101W and R118S, cause severe myoclonic epilepsy of infancy²⁰. Other mutations have also been identified in the Na_v1.5 N-terminus in BrS and Long QT syndrome patients². Altogether this suggests the importance of this poorly explored domain in the function of Na⁺ channels.

According to our results, Na_v1.5 N-terminus plays a critical role in channel expression and trafficking to the surface membrane. Indeed, both N-terminal mutants, R104W and R121W, were mostly retained in the ER, and massively degraded without evidence of reticular stress. A possible explanation is that cells use ER-associated degradation (ERAD) as a protective mechanism to remove proteins that fail to acquire their native conformation. Indeed, during ERAD, misfolded proteins are moved from the ER to the cytosol and degraded by the ubiquitin-proteasome system^{21, 22}. Our results are consistent with this hypothesis since we observed a reduction in mutant protein degradation after treatment with the 26S-subunit ubiquitin-proteasome inhibitor MG132. The role of the N-terminus in Na_v channel trafficking has already been highlighted in a previous study on Na_v1.6. *In vivo*, the Na_v1.6 mutation S21P induced the channel retention in the Golgi apparatus and subsequent degradation, leading the authors to conclude that the Na_v1.6 N-terminus mutation prevents anterograde trafficking of the channel out of the cis-Golgi²³. In our case, we have experimental evidence for N-terminal Na_v1.5 mutant channel retention in the ER, linked to degradation *via* the ubiquitin-proteasome system. Experimental conditions that affect protein folding such as reduced temperature, incubation with

mexiletine, or expression of the polymorphism H558R on the same allele, were not effective in restoring N-terminal mutant channel function. On the contrary, we and others¹⁶ observed that G1743R was partially rescued by incubation with mexiletine. This difference between the N-terminal mutants and G1743R, located near the pore of domain IV, suggests that these mutant channels do not follow the same retention pathway and that misfolding is not likely to be the sole cause of the intracellular retention of N-terminal mutant channels.

The mechanism of mutant channel retention remains to be elucidated. To date, no partner is known to interact with Na_v1.5 N-terminus²⁴. We can hypothesize that the R104W and R121W mutations induce conformational changes of the Na_v1.5 N-terminus, unveiling an ER retention motif not accessible in WT channels. Indeed, the cell quality control mechanisms prevent trafficking of misfolded proteins out of ER. A retention motif such as RXR, RRXX or KKXX may be exposed in the mutants due to the large number of arginine and lysine residues in the Na_v1.5 N-terminus. Such motifs could bind to the coated protein complex I (COPI), preventing trafficking out of the ER and leading to proteasomal degradation²⁵. This hypothesis is supported by our experiments showing a clear co-localization of N-terminal mutants and CD4-KKXX (Figure 3).

A dominant-negative effect of mutant ion channel subunits has frequently been reported for channels formed by multiple α -subunits, such as K_vLQT1 in long QT syndrome²⁶. In contrast, Na_v1.5 α -subunits were not known to form oligomers, therefore, the dominant-negative effect of the R104W, R121W and G1743R channels on WT Na_v1.5 was unexpected. Such an effect was reported once while studying the trafficking-defective mutation L325R in Na_v1.5⁶. Interestingly, several N-terminal mutations in *CACNA1A*, the gene encoding the brain voltage-gated P/Q-type Ca²⁺ channel, whose structure is similar to that of Na_v1.5, showed a dominant-negative effect in ataxia^{27, 28}. The authors postulated that mutant proteins interfere directly or indirectly with either the biosynthesis or the trafficking of WT channels. Our results are in favor of a dominant-negative suppression of WT channels linked to a trafficking defect of mutants. Indeed, R104W and R121W were mostly retained in the ER and subsequently degraded, while the gating-defective but trafficking-competent mutant R878C did not exert a dominant-negative effect on WT channels.

The discovery of the R104W and R121W mutant dominant-negative effect on WT channels suggests either a direct or indirect intracellular interaction between WT and mutant channels. This prompted us to explore the possibility of transcomplementation, a new concept in the field of Na_v channels²⁹⁻³¹. Indeed, the small I_{Na} rescued by co-expression of the gating-defective but trafficking-competent R878C mutant with any of the three ER-retained mutants suggested specific interactions between the R878C channel and the dominant-negative channels. In this hypothesis, the R878C channel may promote mutant processing by occluding ER retention signals on the mutants³⁰ or by providing ER exit codes in trans. Previous reports have demonstrated rescue of trafficking-defective

Nav1.5 mutants by co-expressing the H558R polymorphism^{8, 32, 33}. Recently, Shinlapawittayatorn *et al* showed that small peptides spanning the H558R polymorphism were sufficient to restore the trafficking defect of Nav1.5 mutations, but the mechanism proposed by the authors is the restoration of mutant channel folding within the ER⁸. It has also been suggested that intragenic complementation could occur between H558R and some arrhythmia causing mutations³⁴. The mechanisms of these “complementation phenomenon” remain to be elucidated. We propose that the two N-terminal Nav1.5 mutants studied here are subject to two opposite forces in transfected cells: the first, and the strongest, ensures cell quality control and retains the mutants in the ER, while the second, also called transcomplementation, drives the mutant channels to the plasma membrane.

Interestingly, these experiments led us to reveal the role of Nav1.5 N-terminus in voltage-dependent activation. Firstly we observed that R104K induced a small I_{Na} , as opposed to R104W, showing a positive shift of voltage-dependent activation compared to WT channels. Moreover, co-transfection of the trafficking-defective N-terminal mutants with either WT or R878C channels led to a positive shift of voltage-dependent activation. Our results are in accordance with a previous study by Lee *et al*, who demonstrate that activation of Nav1.2 and Nav1.6 depends on their respective N-terminal sequence¹¹. To our knowledge, ours is the first study to support that the N-terminal part of Nav1.5 can affect the voltage-dependent activation. The mechanism by which the presence of the mutants at the plasma membrane can affect WT voltage-dependent gating remains to be investigated, but these results are consistent with the study of Undrovinas *et al* showing a tight cooperation in channel gating by double and triple simultaneous openings, suggesting a mechanism of synergy between Nav channels³⁵.

From a clinical point of view, the R104W mutation, heterozygous in the BrS patient, should be associated with reduced expression of WT channels in cardiomyocytes, through a novel pathophysiological mechanism leading to retention and degradation of mutant proteins. In addition, Nav1.5 channels present at the membrane would open at a more positive membrane potential threshold, so a greater voltage stimulus is needed to depolarize cells, slowing action potential propagation. These two phenomena are thought to contribute to the patient’s BrS phenotype. Extrapolation of our data to patient management remains hazardous since many other factors, still unknown, may occur to modulate the Nav1.5 function. Nevertheless, it is worth noting that such Nav1.5 mutations associated with a reduced number of channels at the membrane, and causing shifts in activation, could lead to more severe consequences than the numerous previously reported mutations leading to haploinsufficiency.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Rachel Peat for careful reading of the manuscript.

Sources of funding

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Pierre and Marie Curie and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-003-CaRNAC).

Disclosures

None.

References

1. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. 2005;111(5):659-670.
2. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerschicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick GD, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin JA, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury BA, Guicheney P, Wilde AA, Brugada R, Schott JJ, Ackerman MJ. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7(1):33-46.
3. Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12(2):268-272.
4. Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2011;108(7):884-897.
5. Abriel H. Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):2-11.
6. Keller DI, Rougier JS, Kucera JP, Benammar N, Fressart V, Guicheney P, Madle A, Fromer M, Schlapfer J, Abriel H. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovasc Res*. 2005;67(3):510-519.
7. Viswanathan PC, Benson DW, Balser JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest*. 2003;111(3):341-346.
8. Shinlapawittayatorn K, Dudash LA, Du XX, Heller L, Poelzing S, Ficker E, Deschenes I. A Novel Strategy Using Cardiac Sodium Channel Polymorphic Fragments To Rescue Trafficking-Deficient SCN5A Mutations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(5):500-509.
9. Holst AG, Liang B, Jespersen T, Bundgaard H, Haunso S, Svendsen JH, Tfelt-Hansen J. Sick Sinus Syndrome, Progressive Cardiac Conduction Disease, Atrial Flutter and Ventricular Tachycardia Caused by a Novel SCN5A Mutation. *Cardiology*. 2010;115(4):311-316.
10. Lin MT, Wu MH, Chang CC, Chiu SN, Theriault O, Huang H, Christe G, Ficker E, Chahine M. 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*. 2008;5(11):1567-1574.
11. Lee A, Goldin AL. Role of the amino and carboxy termini in isoform-specific sodium channel variation. *J Physiol*. 2008;586(16):3917-3926.
12. Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins RP, Fressart V, Berthet M, Schott JJ, Leenhardt A, Probst V, Le Marec H, Hainque B, Coulombe A, Hatem SN, Guicheney P. MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(3):261-268.
13. Duboscq-Bidot L, Xu P, Charron P, Neyroud N, Dilanian G, Millaire A, Bors V, Komajda M, Villard E. Mutations in the Z-band protein myopalladin gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2008;77(1):118-125.
14. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881-891.
15. Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM. Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic*. 2004;5(11):821-837.
16. Valdivia CR, Tester DJ, Rok BA, Porter CB, Munger TM, Jahangir A, Makielski JC, Ackerman MJ. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res*. 2004;62(1):53-62.

17. Zhang Y, Wang T, Ma A, Zhou X, Gui J, Wan H, Shi R, Huang C, Grace AA, Huang CL, Trump D, Zhang H, Zimmer T, Lei M. Correlations between clinical and physiological consequences of the novel mutation R878C in a highly conserved pore residue in the cardiac Na⁺ channel. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;194(4):311-323.
18. Gui J, Wang T, Jones RP, Trump D, Zimmer T, Lei M. Multiple loss-of-function mechanisms contribute to SCN5A-related familial sick sinus syndrome. *PLoS One*. 2010;5(6):e10985.
19. Brewer JW, Hendershot LM. Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. *Nat Immunol*. 2005;6(1):23-29.
20. Lossin C. A catalog of SCN1A variants. *Brain Dev*. 2009;31(2):114-130.
21. Brodsky JL, Scott CM. Tipping the delicate balance: defining how proteasome maturation affects the degradation of a substrate for autophagy and endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD). *Autophagy*. 2007;3(6):623-625.
22. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78(5):761-771.
23. Sharkey LM, Cheng X, Drews V, Buchner DA, Jones JM, Justice MJ, Waxman SG, Dib-Hajj SD, Meisler MH. The ataxia3 mutation in the N-terminal cytoplasmic domain of sodium channel Na(v)1.6 disrupts intracellular trafficking. *J Neurosci*. 2009;29(9):2733-2741.
24. Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res*. 2011.
25. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*. 2006;13(3):385-392.
26. Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J*. 1997;16(17):5472-5479.
27. Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, Ramesh V, Zuberi SM, Kullmann DM, Hanna MG. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet*. 2001;358(9284):801-807.
28. Mezghrani A, Monteil A, Watschinger K, Sinnegger-Brauns MJ, Barrere C, Bourinet E, Nargeot J, Striessnig J, Lory P. A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J Neurosci*. 2008;28(17):4501-4511.
29. Cormet-Boyaka E, Jablonsky M, Naren AP, Jackson PL, Muccio DD, Kirk KL. Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8221-8226.
30. Owsianik G, Cao L, Nilius B. Rescue of functional DeltaF508-CFTR channels by co-expression with truncated CFTR constructs in COS-1 cells. *FEBS Lett*. 2003;554(1-2):173-178.
31. Villmann C, Oertel J, Ma-Hogemeier ZL, Hollmann M, Sprengel R, Becker K, Breitingner HG, Becker CM. Functional complementation of Glra1(spdl-ot), a glycine receptor subunit mutant, by independently expressed C-terminal domains. *J Neurosci*. 2009;29(8):2440-2452.
32. Poelzing S, Forleo C, Samodell M, Dudash L, Sorrentino S, Anaclerio M, Troccoli R, Iacoviello M, Romito R, Guida P, Chahine M, Pitzalis M, Deschenes I. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation*. 2006;114(5):368-376.
33. Marangoni S, Di Resta C, Rocchetti M, Barile L, Rizzetto R, Summa A, Severi S, Sommariva E, Pappone C, Ferrari M, Benedetti S, Zaza A. A Brugada syndrome mutation (p.S216L) and its modulation by p.H558R polymorphism: standard and dynamic characterization. *Cardiovasc Res*. 2011;91(4):606-616.
34. Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics*. 2003;12(3):187-193.

35. Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC. Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ Res.* 1992;71(5):1231-1241.

Table 1: Kinetics properties of I_{Na} recorded in HEK293 cells transfected with WT and mutants alone or ½ WT + ½ mutant.

Na ⁺ channels	Peak current density (pA/pF)	p	V _{1/2} activation (mV)	p	V _{1/2} inactivation (mV)	p
WT	160 ± 11 (n=18)		-44.2 ± 1.6 (n=17)		-81.7 ± 0.6 mV (n=10)	
½ WT	123 ± 10 (n=18)	*	-44.7 ± 1.8 (n=16)	ns		
R104W	nd (n=15)		na		na	
R104K	19.4 ± 2.3 (n=9)	‡	-35.7 ± 2.1 (n=8)	‡	-79.2 ± 0.6 mV (n=6)	ns
R121W	nd (n=13)		na		na	
R878C	nd (n=15)		na		na	
G1743R	1.5 ± 0.8 (n=5)	‡	na		na	
G1743R + mexiletine	14.7 ± 1.9 (n=6)	‡	-27.3 ± 2.4 (n=6)	‡		
½ WT + ½ R104W	33.6 ± 11.7 (n=10)	‡	-36.5 ± 1.7 (n=10)	‡	-82.8 ± 0.5 mV (n=9)	ns
½ WT + ½ R121W	29.4 ± 5 (n=15)	‡	-36.8 ± 1.4 (n=13)	‡		
½ WT + ½ G1743R	30.2 ± 5 (n=13)	‡	-33.9 ± 1.4 (n=11)	‡		
½ WT + ½ R878C	71.1 ± 6.9 (n=17)	‡	-38.3 ± 0.6 (n=12)	†		
½ R878C + ½ R104W	5.7 ± 1.3 (n=9)		na		na	
½ R878C + ½ R121W	24.1 ± 4.8 (n=5)		-32.5 ± 1.4 (n=5)	‡		
½ R878C + ½ G1743R	24.2 ± 3.7 (n=13)		-26 ± 1.3 (n=11)	‡		

Data are presented as mean ± SEM. Peak current density is given at -20 mV. WT indicates wild type, nd, not detectable, na, not available because of the small currents, and ns not significant. *p<0.05, †p≤0.005, ‡p≤0.001 compared with WT.

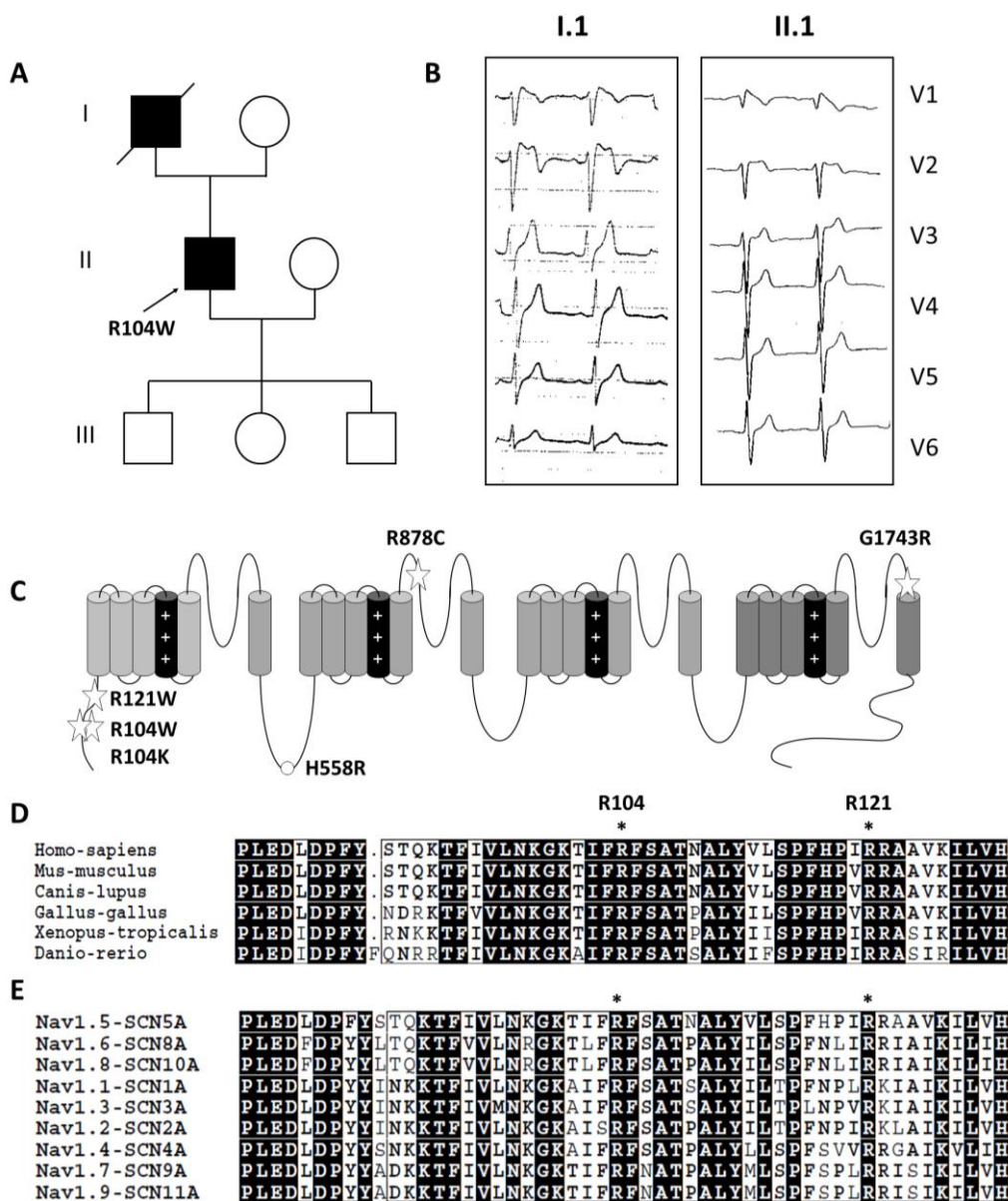


Figure 1: Identification of the R104W *SCN5A* mutation in a patient with BrS.

(A) Pedigree of the family. The proband (II.1) who carries the mutation is indicated by an arrow, squares represent males, circles females, filled symbols affected subjects and open symbols healthy subjects. The father of the proband (I.1) died suddenly during sleep at the age of 61. (B) ECG recordings of precordial leads (V1 to V6) of the proband and his father at rest, showing typical type 1 BrS pattern. (C) Schematic representation of the hNav_v1.5 α -subunit. Stars represent location of mutations characterized in this study, and the circle the H558R polymorphism. (D) Sequences of Nav_v1.5 N-terminus across species. Conserved amino acids are in boxes. Residues R104 and R121 are indicated by small stars. Sequence alignment was performed using the following NCBI accession numbers: Homo sapiens: NP_932173.1, Mus musculus: NP_067519.2, Canis lupus: NP_001002994.1, Gallus gallus: XP_418535.2, Xenopus tropicalis: XP_002932534, Danio rerio: DQ837300.1. (E) Alignment of N-terminal sequences of human voltage dependent Na⁺ channels Nav_v1.1 to Nav_v1.9. Sequence alignment was done using the following accession numbers: Nav1.1: NP_001189364.1, Nav1.2: NP_001035233.1, Nav1.3: NP_008853.3, Nav1.4: NP_000325.4, Nav1.5: NP_932173.1, Nav_v1.6: NP_001171455.1, Nav_v1.7: NP_002968.1, Nav_v1.8: NP_006505.2, Nav_v1.9: NP_054858.2.

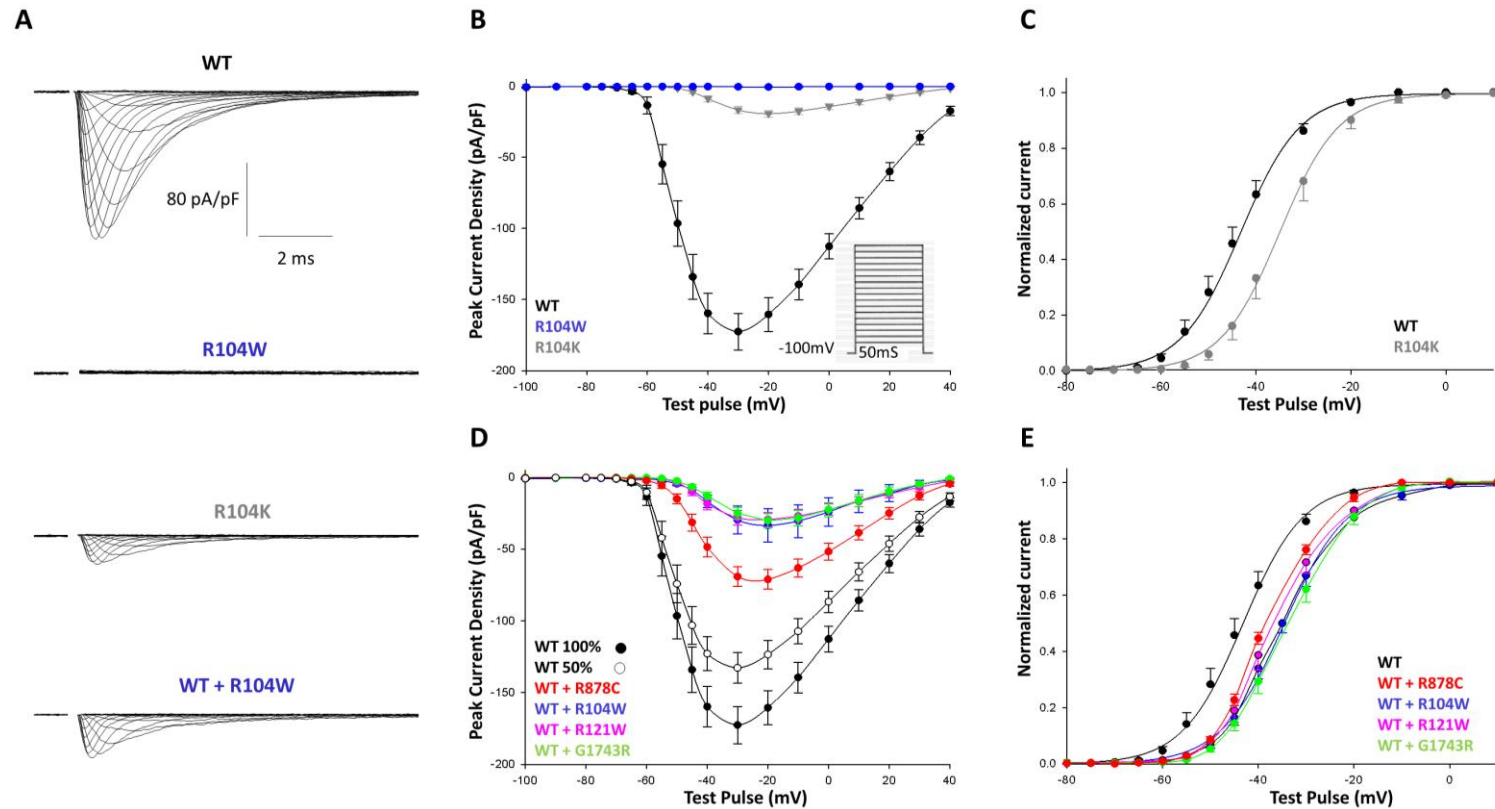


Figure 2: Electrophysiological characterization of WT and mutant channels.

(A) Representative Na^+ current traces of $\text{Na}_v1.5$ WT, R104W, R104K and WT+R104W channels in HEK293 cells transfected with a total of 0.6 μg of plasmid. (B) Current density-voltage relationships of WT, R104W and R104K channels. R104K gave rise to a small I_{Na} (12% of WT I_{Na} density). (C) V_m -activation relationships of WT and R104K channels. R104K activation was shifted by 8.6 mV ($n=8$) compared to WT. (D) I/V relationships in cells co-transfected with 0.3 μg of WT-Nav1.5 plasmid and 0.3 μg of each mutant-channel plasmid. WT 100% indicates that cells were transfected with 0.6 μg of WT plasmid, and WT 50% that cells were transfected with 0.3 μg of WT plasmid. Only R878C did not exert a dominant-negative suppression on WT I_{Na} . (E) Activation curves of WT+mutant co-transfected HEK293 cells. I_{Na} voltage-dependent activation in co-transfected cells was shifted to more positive potentials compared to cells transfected with WT alone.

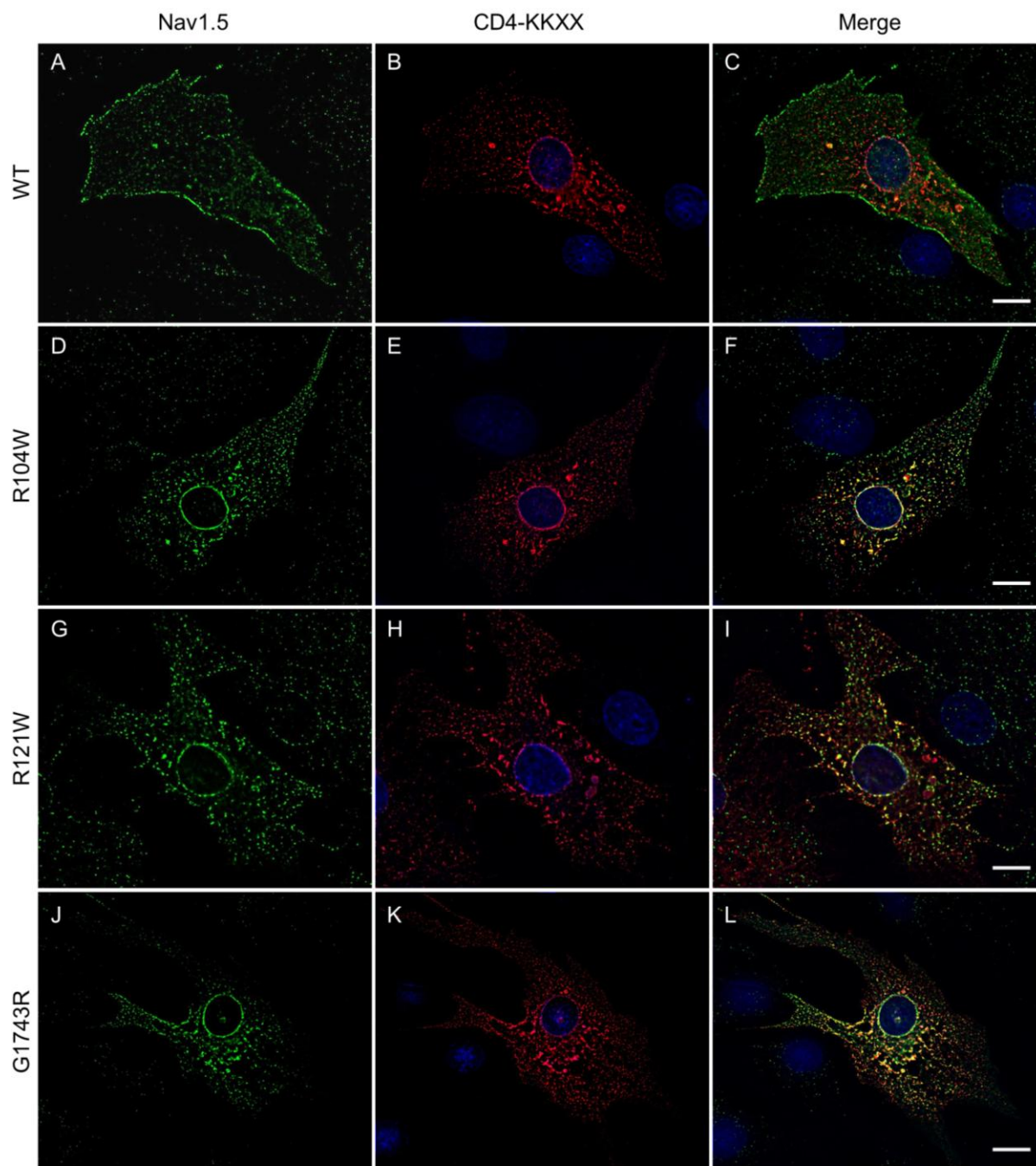


Figure 3: R104W, R121W and G1743R are mostly retained in the ER in RNC.

Three-dimensional deconvolution images of eGFP-Nav_v1.5 (green) and CD4-KKXX (red) in RNC co-transfected with either CD4-KKXX and eGFP-Nav_v1.5 WT construct (panels A, B and C), or CD4-KKXX and R104W (panels D, E and F), or CD4-KKXX and R121W (panels G, H and I), or CD4-KKXX and G1743R (panels J, K and L). Nuclei are stained with DAPI (blue) in all images. Note, in merged image of RNC transfected with WT channel (panel C), that Nav_v1.5 is mostly expressed at the cell surface membrane, as opposed to CD4-KKXX, which is retained in the ER. In contrast, Nav_v1.5 R104W, R121W and G1743R mutant merged images (panels F, I and L) show numerous yellow dots, indicating that Nav_v1.5 is mostly retained in the ER, similar to CD4-KKXX. Scale bar: 10 μ m.

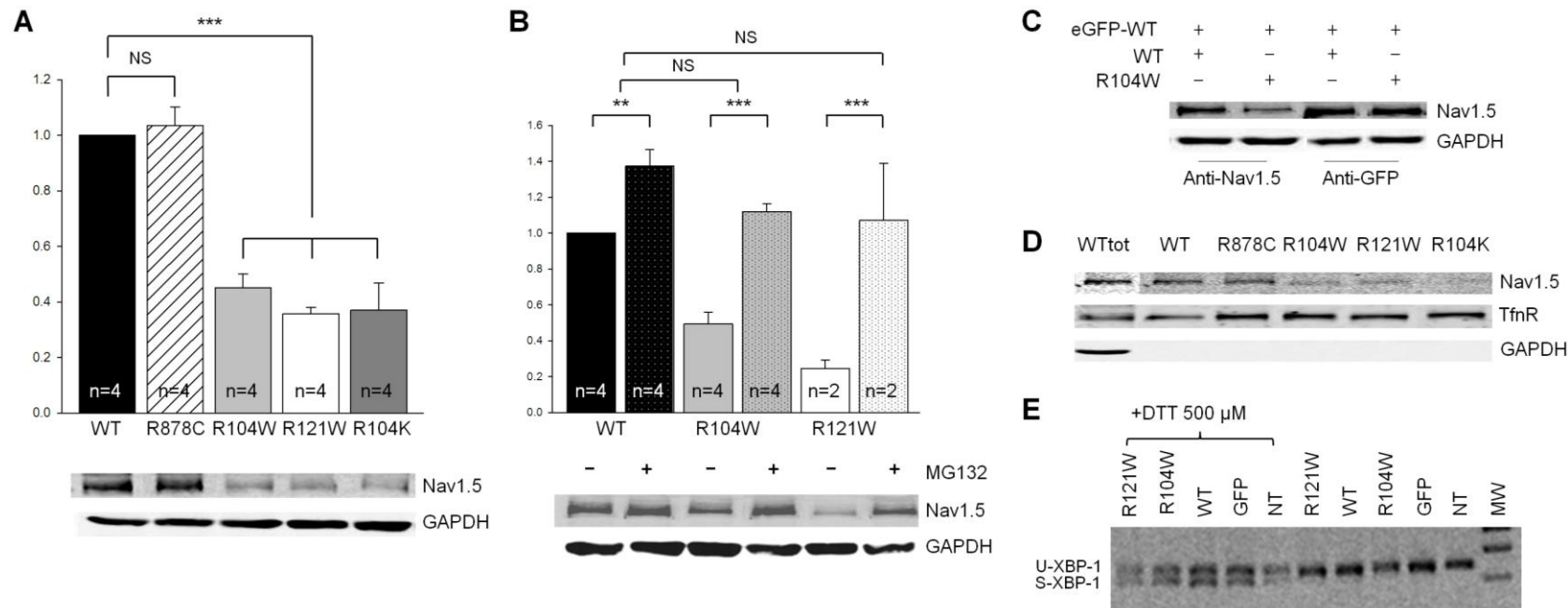


Figure 4: Biochemical analysis.

(A) Western blots of eGFP-Nav_v1.5 performed on transfected HEK293 cell total lysates. NS indicates not significant and *** $p \leq 0.001$. Data are represented as arbitrary units. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as control of total protein loaded. N-terminal mutant protein quantities are significantly lower than WT, suggesting mutant-protein degradation. (B) Western blots of Nav_v1.5 performed on transfected HEK293 cell total lysates after incubation with or without the proteasome inhibitor MG132. NS indicates not significant, ** $p = 0.004$ and *** $p \leq 0.001$. Data are represented as arbitrary units. GAPDH was used as control of total protein loaded. MG132 prevented degradation of R104W and R121W mutant channels. (C) Western blots of eGFP-WT, WT and R104W channels in total HEK293 cell lysates. The anti-eGFP antibody reveals only the eGFP-WT channels, while the anti-Nav_v1.5 antibody reveals all e-GFP, WT and R104W channels ($n = 2$). GAPDH was used as control of total protein loaded. These data suggest that WT channels are not degraded by the ubiquitin-proteasome system when co-expressed with the R104W mutant channels. (D) Cell surface biotinylation experiments. WTtot indicates WT channel total protein. GAPDH was used as control of total protein loading and transferrin receptor (TfnR) as control of biotinylated protein loaded. Note that the surface membrane expression of N-terminal mutant channels was dramatically reduced compared to WT and R878C. (E) RT-PCR of XBP-1 mRNA from HEK293 cells transfected with N-terminal Nav_v1.5 mutants. MW indicates molecular weight and NT not transfected cells. In absence of DTT, neither of the two mutants induced ER stress, as shown by the absence of XBP-1 spliced mRNA (S-XBP-1).

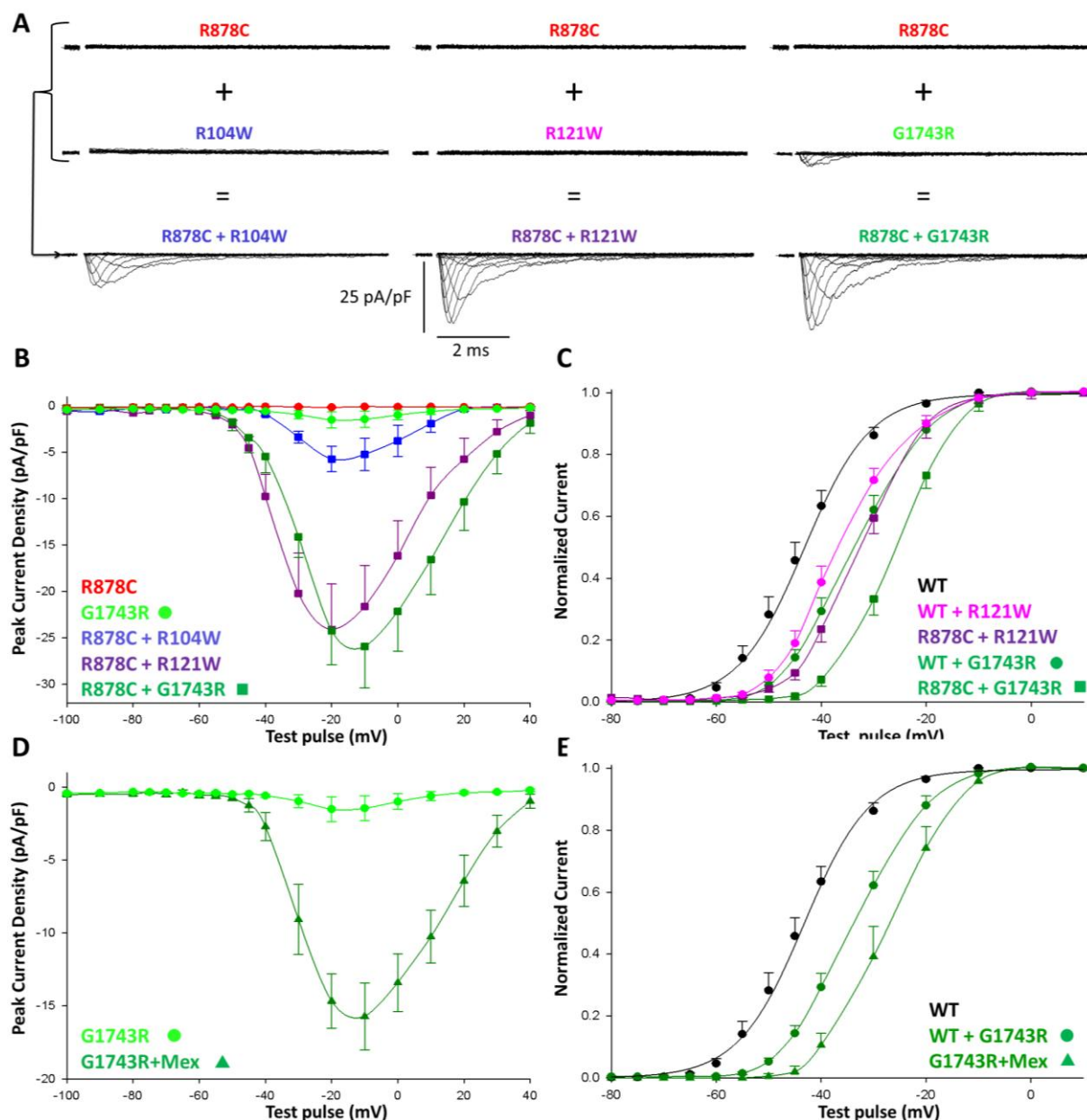


Figure 5: Electrophysiological characterization of I_{Na} in cells coexpressing WT and mutants.

(A) Representative Na^+ current traces of R878C, R104W, R121W and G1743R alone or co-expressed with R878C in HEK293 cells transfected with a total of 0.6 μg of DNA. When I_{Na} was very small (co-expression with R878C studies and rescue of G1743R by mexiletine), cells were bathed with a 135 mM Na^+ solution. (B) I/V relationships of R878C, G1743R, R878C+R104W, R878C+R121W and R878C+G1743R channels. R878C was able to restore a small Na^+ current when co-expressed with both N-terminal mutants and G1743R (2%, 8.5% and 8.6% of WT I_{Na} density). (C) Activation curves of WT, R121W+WT, R121W+R878C, G1743R+WT and G1743R+R878C channels. Activation was shifted by 7.4 mV, 11.7 mV, 10.3 mV and 18.2 mV compared to WT. (D) I/V relationships in cells transfected with G1743R and incubated with mexiletine. Mexiletine was able to restore a small Na^+ current (5.2% of WT I_{Na} density). (E) Activation curves in WT, WT+G1743R, and G1743R+mexiletine transfected HEK293 cells. I_{Na} voltage-dependent activation was shifted by +9 mV in WT+G1743R transfected cells and by +17 mV in G1743R+mexiletine cells compared to cells transfected with WT alone.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Methods

HEK293 cell culture and transfection

HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. HEK293 cells, which do not express endogenous Na_v channels, were transfected with 0.6 µg of pcDNA3.1-eGFP-SCN5A-WT or mutants per 35 mm dish well using JET PEI (Polyplus Transfection, New York, USA) according to the manufacturer's instructions. To mimic the heterozygous state of the BrS patient, cells were co-transfected with 0.3 µg of pcDNA3.1-eGFP-SCN5A-WT and 0.3 µg of each mutant channel plasmid. In these experiments, control cells were transfected with either 0.6 µg of WT (WT 100%), or 0.3 µg of WT and 0.3 µg of an empty vector (WT 50%) to check that they were not saturated by Na_v1.5 transfection. A HEK293 cell line stably expressing human Na_v1.5 (gift of Dr H. Abriel, Bern, Switzerland) was cultured in the presence of 25 µg/ml of zeocin (Invitrogen).

Solutions and drugs

Thirty-six hours after transfection HEK293 cells were trypsinized, and seeded to a density that enabled single cells to be identified. Green positive cells were chosen for patch clamp electrophysiology experiments. Cells were bathed in an extracellular Tyrode solution containing (in mM): 135 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 20 glucose, 10 HEPES, pH 7.4 (NaOH). Patch pipette medium was (in mM): 5 NaCl, 140 CsCl, 2 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 5 EGTA, 10 HEPES, adjusted to pH 4.2 with CsOH. During current recording, cells were perfused with an external solution with reduced Na⁺ concentration containing (in mM): 80 NaCl, 50 CsCl, 2 CaCl₂, 2.5 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 with CsOH. HEK293 Na_v1.5 stable cell line perfusion medium contained (in mM): 25 NaCl, 108.5 CsCl, 0.5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 2.5 MgCl₂, also adjusted to pH 7.4 with CsOH.

Some HEK293 cells transfected with R104W, R121W or G1743R mutants were cultured with the class I anti-arrhythmic agent mexiletine in several concentrations (30, 60, 140, 250 or 500 µM) 48h after transfection. In all cases cells were restored to their normal buffer and washed 30 min before patch clamp recordings.

Electrophysiological recordings

Ionic currents were recorded by the whole-cell patch-clamp technique with the amplifier Axopatch 200B, (Axon Instruments, CA, USA). Patch pipettes (Corning Kovar Sealing code 7052, WPI) had resistances of 1.5 to 2.5 MΩ. Currents were filtered at 5 kHz (-3 dB, 8-pole low-pass Bessel filter) and digitized at 30 kHz (NI PCI-6251, National Instruments, Austin, Texas). Data was acquired and analyzed with ELPHY® software (G.Sadoc, CNRS, Gif/Yvette, France).

In order to measure peak I_{Na} amplitude and determine current-voltage relationships (I/V curves), currents were elicited by test potentials of 0.2 Hz frequency to -100 mV to 60 mV by increments of 5 or 10 mV from a holding potential of -120 mV. For the activation-V_m protocol, currents were elicited by 100-ms depolarizing pulses applied at 0.2 Hz from a holding potential of -120 mV, in 5- or 10-mV increments between -100 and +60 mV. The steady-state inactivation-V_m protocol was from a holding potential of -120 mV; a 2-s conditioning prepulse was applied in 5- or 10-mV increments between -140 and +30 mV followed by a 50-ms test pulse to -20 mV at 0.2 Hz.

Data for activation-V_m and steady-state availability-V_m relationship of I_{Na} were fitted to the Boltzmann equation:

$$Y = 1 / \{1 + \exp [-(V_m - V_{1/2}) / k]\}$$

where V_m is the membrane potential, V_{1/2} is the half-activation or half-availability potential, and k is the inverse slope factor. For activation-V_m curves, Y represents the relative conductance and k is > 0. For availability-V_m curves, Y represents the relative current (I_{Na}/I_{Na}max) and k is < 0.

Immunocytochemistry

Indirect immunofluorescence was performed on RNC primary culture fixed with methanol for 10 min at -20°C. Cells were then washed twice for 5 min with Phosphate Buffer Saline (PBS), blocked in PBS-5% BSA for 30 min at room temperature. Cells were incubated for one hour with primary antibodies: rabbit-anti-GFP (1:300, Torrey Pines Biolabs) to detect Na_v1.5-GFP, mouse anti-Flag (1:300, Stratagene), rabbit anti-Giantin for Golgi apparatus (1:1000, Abcam), rabbit anti-LampI for lysosomes (1:200, Abcam), and rabbit anti-LC3 for proteasome (1:1000, Sigma). Detection was performed after two washes with PBS and one hour of incubation with secondary antibodies: chicken anti-mouse Alexa Fluor 594, goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000, Molecular Probes) and the nuclear dye DAPI (1:500, Sigma) diluted in the blocking buffer. Control experiments were performed by omitting the primary antibodies.

Protein extraction

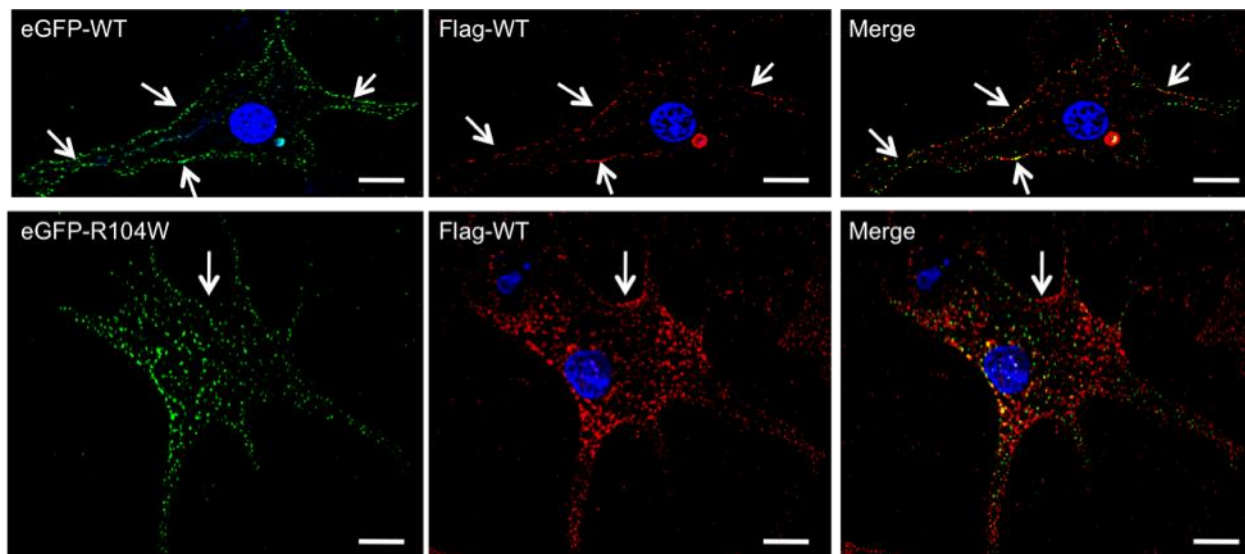
Forty-eight hours after transfection with WT or mutant constructs, HEK293 cells were washed with PBS and lysed in Lysis Buffer (50 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate and complete protease inhibitor cocktail from Roche) for one hour at 4°C on a wheel. The soluble fractions from two subsequent 30-min centrifugations at 14,000 g (4°C) were then used for the experiments. In order to load each lane of the SDS-page with equivalent amounts of total protein, the protein concentration of each lysate was measured in duplicate by Bradford assay using a BSA standard curve.

Biotinylation assay

Forty-eight hours after transfection with WT or mutant constructs, HEK293 cells were washed twice with PBS and biotinylated for 60 minutes at 4°C using PBS containing 1.5 mg of EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce). Plates were incubated 10 min at 4°C with PBS-100 mM Glycine (to quench unlinked biotin) and washed twice with PBS. Cells were then lysed for one hour at 4°C with Lysis Buffer (composition described in the previous paragraph). After centrifugation at 14,000 g for 30 min (4°C), supernatants were incubated with Immobilized NeutrAvidin beads (Pierce) over night at 4°C and pelleted by centrifugation. After three washes with Lysis Buffer, the biotinylated proteins were eluted with Laemmli sample buffer with DTT 2X at 37°C for 30 min. Biotinylated proteins were then analyzed by Western Blot as described below.

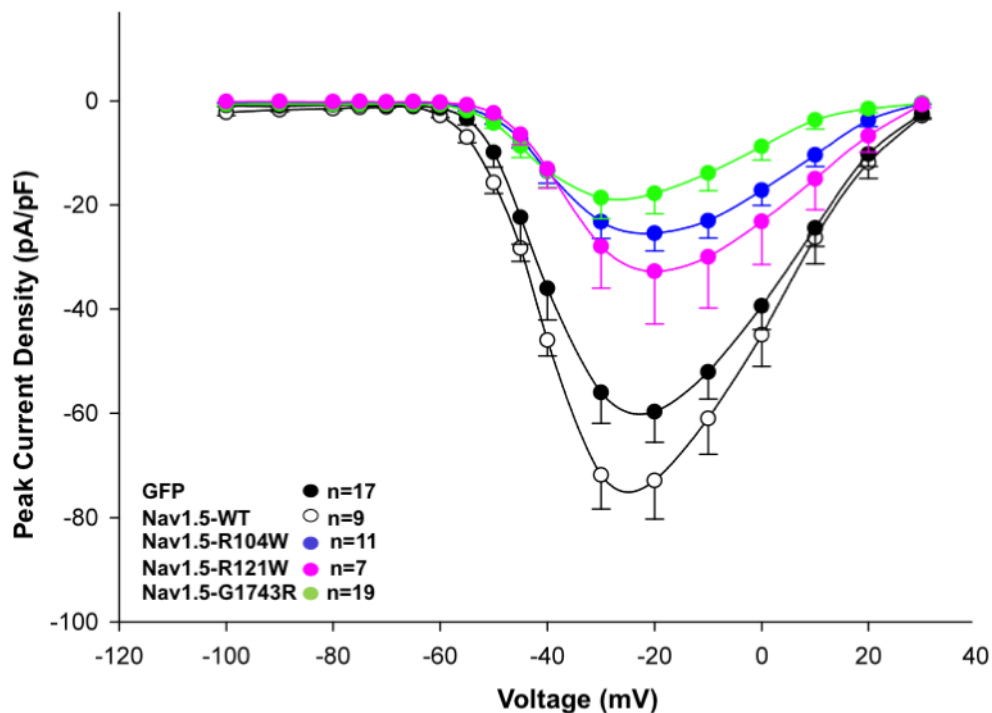
Western blot

Proteins were separated on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel, then transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with primary antibodies followed by infrared IRDye secondary antibodies (LI-COR Biosciences, USA). Proteins were detected using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, USA). Signals were quantified using ImageJ software and normalized to WT levels.



Online Figure 1: R104W impairs WT channel trafficking in RNC.

RNC were co-transfected with eGFP-WT and Flag-WT channels (upper panels) or with eGFP-R104W and Flag-WT channels (lower panels), and immunostaining was performed using anti-GFP and anti-Flag antibodies. Expression of WT channels only exhibits clear membrane staining, whereas co-expression of R104W and WT channels shows stronger perinuclear and intracellular labeling. Thus R104W seems to lead to retention of WT channels in RNCs in accordance with the dominant-negative effect observed for this mutant. Scale bar: 10 μ m.



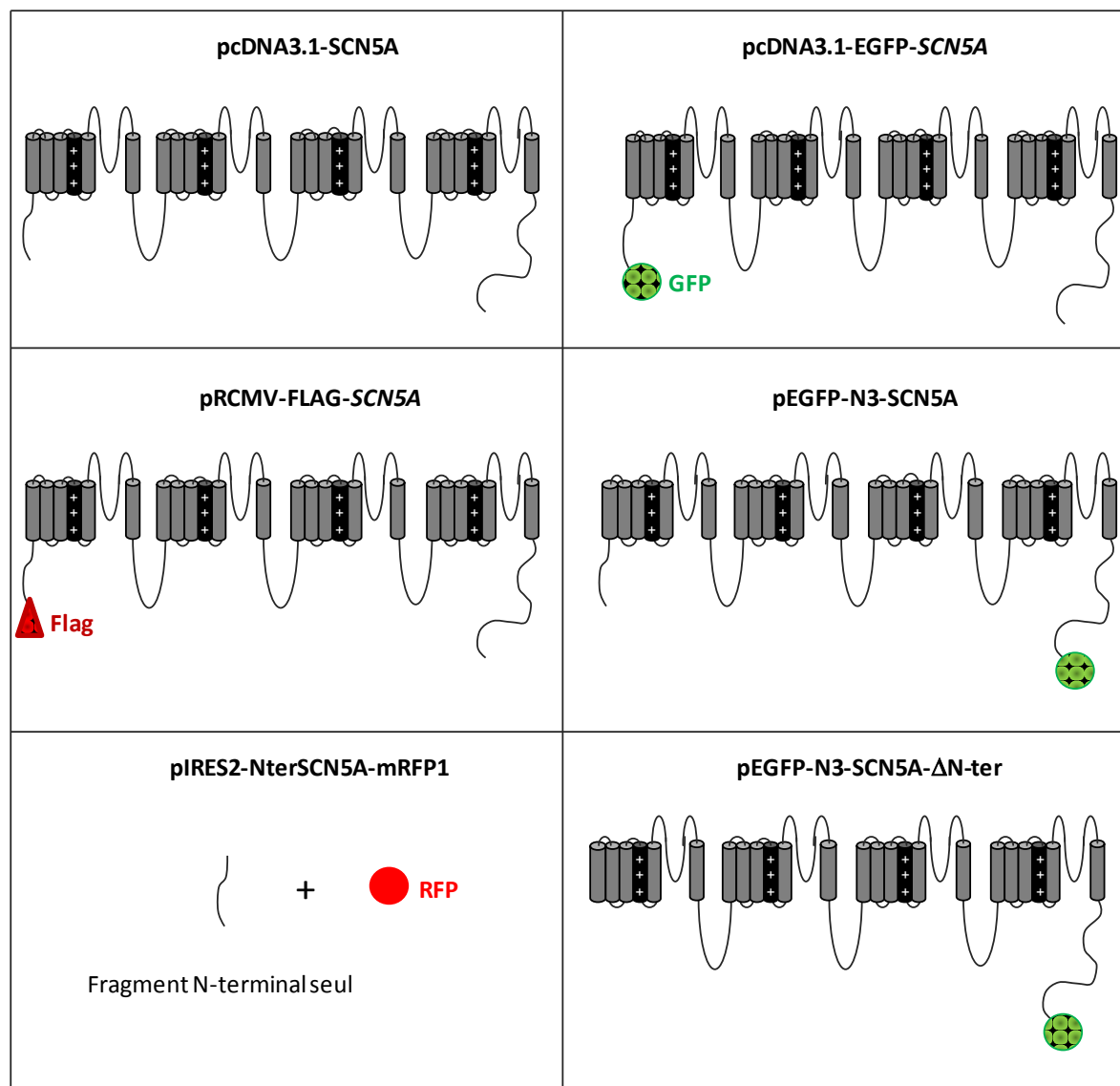
Online Figure 2: Dominant-negative effect of R104W, R121W and G1743R in HEK Na_v1.5-stable cells.

I/V relationships of WT, R104W, R121W or G1743R channels in Na_v1.5-stable HEK293 cells transfected with WT or mutant channels. GFP alone was used as a control. Cells were perfused with a 25mM-Na⁺ solution. R104W, R121W and G1743R significantly decreased the sodium current density when compared to cells transfected with GFP alone (WT+GFP: -59.7 ± 5.8 pA/pF; WT+WT: -72.8 ± 7.4 pA/pF, NS; WT+R104W: -25.5 ± 3.4 pA/pF, $p=0.03$; WT+G1743R: -17.8 ± 4 pA/pF, $p<0.001$; WT+R121W: -32.8 ± 10.1 pA/pF, $p=0.03$).

B/ Implication de la partie N-terminale dans la fonction du canal sodique cardiaque

Nos précédentes conclusions laissent à penser que la partie N-terminale du canal sodique cardiaque joue un rôle important dans le transport à la membrane du canal, mais aussi dans son activation dépendante du potentiel. Néanmoins, beaucoup de questions restent sans réponse. Comment cette région régule-t-elle le transport du canal? Un éventuel partenaire peut-il se lier à cette région très conservée? Comment joue-t-elle un rôle dans l'activation?

Figure 24 : les différentes constructions du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$



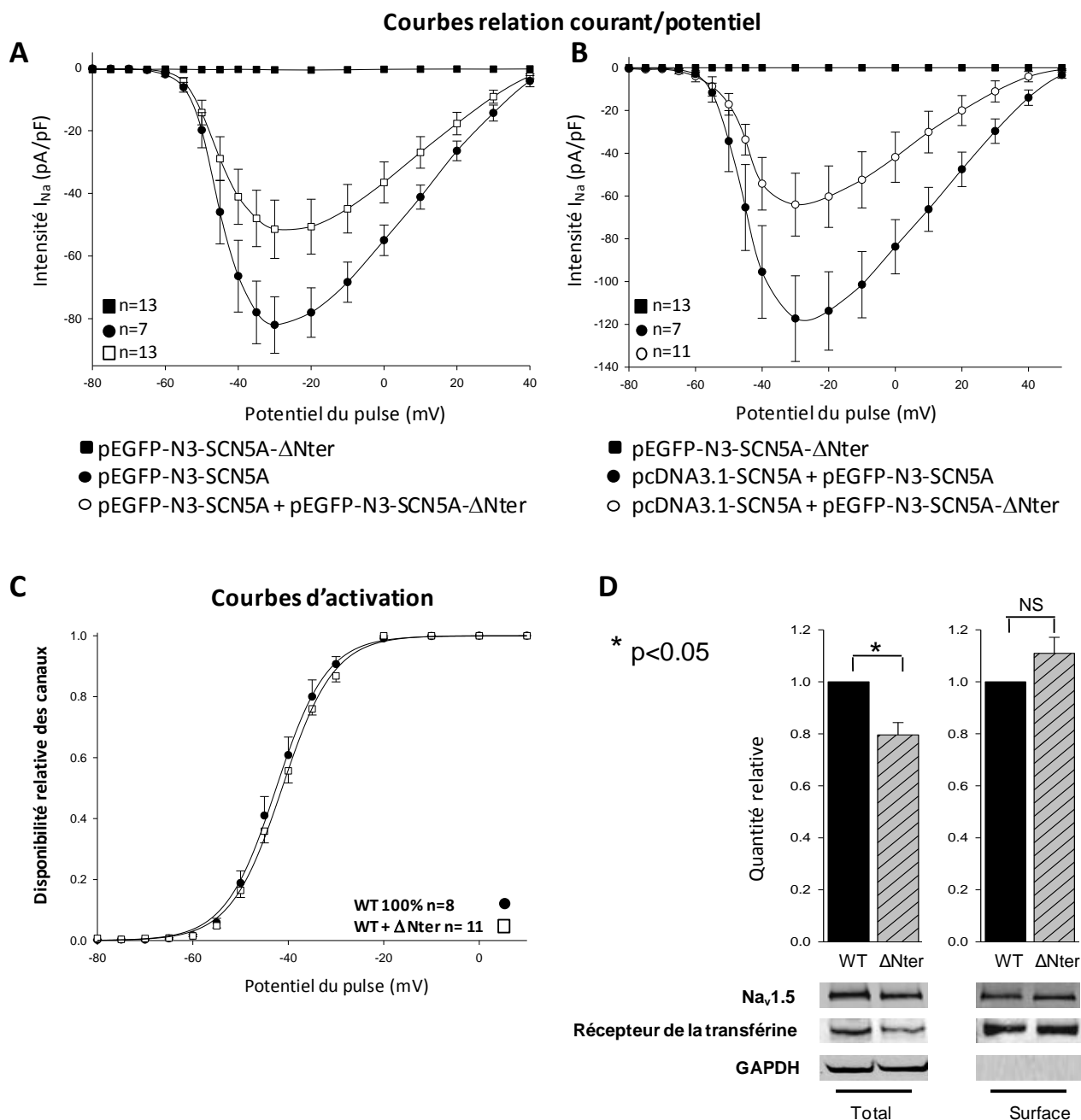
Représentation schématique des différentes constructions utilisées dans notre étude.

Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé deux constructions. La première, Δ Nter-Nav1.5, contient le canal sans sa partie N-terminale intracytoplasmique fusionné à la GFP par son extrémité carboxyterminale (Figure 24). La seconde, Nter-Nav1.5, contient le fragment N-terminal seul non fusionné au gène rapporteur la RFP (Red Fluorescente Protein). J'ai réalisé cette dernière construction par sous-clonage du fragment de 420 pb (paires de bases) contenant la séquence codant la partie N-terminale de Nav1.5 dans le plasmide pIRES-mRFP1 grâce aux enzymes de restriction NheI et BamHI. Ainsi, le plasmide pIRES2-mRFP1-Nter-Nav1.5 (Figure 24), résultat de ce sous clonage, permet l'expression du fragment N-terminal seul non fusionné à la RFP utilisée comme rapporteur. Cette construction nous permettra d'étudier le rôle de la partie N-terminale de Nav1.5 sur la fonction du canal.

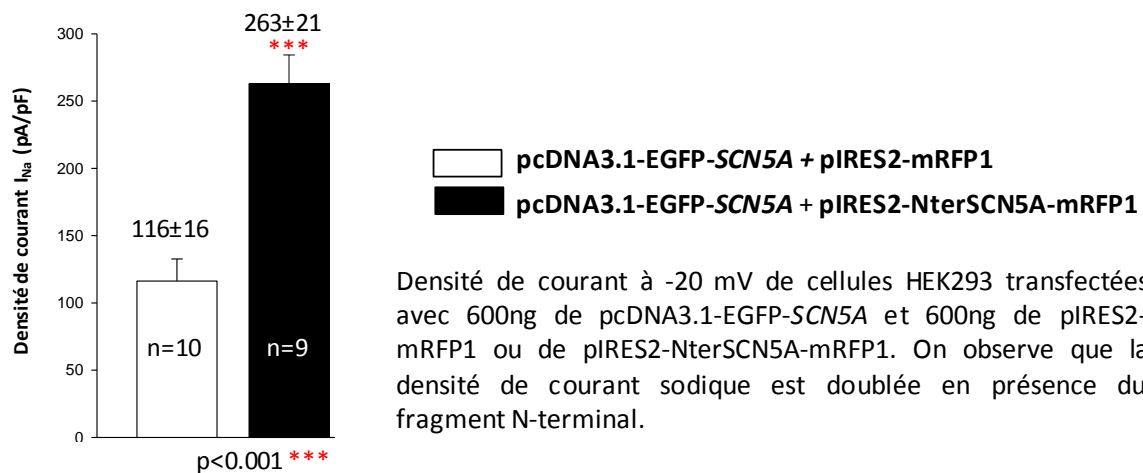
Le canal Δ Nter-Nav1.5 transfecté dans les HEK293 ne génère pas de courant sodique. Pourtant, les résultats de biotinylation et de western blot ont montré que ce canal était capable d'atteindre la membrane au même titre que le canal sauvage et n'était pas dégradé (Figure 25D). De plus, sa coexpression avec le canal sauvage n'exerce pas d'effet dominant négatif, ni même de décalage de la courbe d'activation (Figure 25). Ces résultats suggèrent que la partie N-terminale n'est pas requise pour le transport du canal sodique cardiaque à la membrane, mais semble être indispensable à son ouverture. On notera que ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cas de la coexpression avec le mutant R878C-Nav1.5, ce dernier est non fonctionnel, non dégradé, capable d'atteindre la membrane et n'exerce pas d'effet dominant négatif sur le canal sauvage. Néanmoins, la présence de ce dernier semble altérer l'activation du canal sauvage, ce qui n'est pas le cas du canal Δ Nter-Nav1.5.

La cotransfection du fragment N-terminal avec le canal sauvage induit une augmentation très significative du pic de courant I_{Na} (Figure 26). Ceci suggère que la partie N-terminale seule pourrait augmenter le courant sodique. Ce résultat surprenant suggère que la partie N-terminale du canal sodique pourrait être un élément régulateur de son transport à la membrane. Nous pourrions spéculer qu'un partenaire inconnu pourrait se lier à ce fragment et inhiber son transport à la membrane. Aussi, en présence d'un fragment N-terminal, ce dernier pourrait entrer en compétition avec le canal pour lier le partenaire, ce qui faciliterait le transport à la membrane du canal.

Figure 25 : Etudes électrophysiologiques du canal Δ Nter- $\text{Na}_v1.5$



A. Courbe de relation courant/potentiel de cellules HEK293 transfectées avec un total de 600 ng de plasmides: pEGFP-N3-SCN5A- Δ Nter, pEGFP-N3-SCN5A ou les deux (1/1) **B.** Courbe de relation courant/potentiel de cellules HEK293 transfectées avec 300ng de pcDNA3.1-SCN5A et 300ng de pEGFP-N3-SCN5A ou de pEGFP-N3-SCN5A- Δ Nter. **C.** Courbe d'activation en fonction du potentiel après transfection du canal sauvage ou des deux canaux. Dans les deux cas la présence du mutant n'exerce pas d'effet dominant négatif. La courbe d'activation n'est pas décalée vers des différences de potentiels plus positives en présence du canal Δ Nter- $\text{Na}_v1.5$. **D.** Quantification de protéines totales et de protéines membranaires par western blot et biotinylation. Le canal sodique cardiaque privé de sa région N-terminale n'est pas dégradé et est capable d'atteindre la membrane plasmique dans des cellules HEK293.

Figure 26: Effet du fragment N-terminal sur la fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ 

II. Etude fonctionnelle d'une mutation induisant la formation d'un codon stop prématuré dans la partie C-terminale de Na_v1.5

A/ Introduction

Le canal sodique cardiaque est responsable du pic de courant sodique entrant (I_{Na}) qui initie le potentiel d'action et permet la propagation de la dépolarisation dans le myocarde. Il influence également la repolarisation et la période réfractaire grâce au courant entrant tardif (I_{NaL}) [3, 269].

Les mutations du gène *SCN5A* qui augmentent le courant lent (gain de fonction) sont responsables du SQT de type 3 [270]. Les mutations conduisant à une réduction du courant sodique (perte de fonction) sont à l'origine de troubles du rythme ventriculaire telles que le SBr mais aussi de troubles de la conduction atrio-ventriculaire (CCD) et plus rarement des dysfonctions du nœud sinusal (DNS) [269]. Néanmoins, les mécanismes par lesquels une mutation mène à l'une ou l'autre des pathologies parfois au sein d'une même famille restent inconnus [271].

La région C-terminale intracytoplasmique du canal sodique cardiaque (résidus 1773-2016) joue un rôle important dans le transport et la localisation du canal au sarcolemme grâce à l'interaction du canal avec certains partenaires de cette région, tels que la SAP97, la syntrophine et la protéine Nedd4 [129, 203, 211]. De plus, elle joue un rôle dans l'inactivation du canal grâce au domaine hélice-boucle-hélice, un mécanisme régulé par des partenaires comme la calmoduline et FHF1B [99, 108]. Aussi, l'altération de cette région peut modifier la densité de courant I_{Na} mais aussi affecter le courant tardif I_{NaL} .

Cormier et coll. ont montré que la partie proximale de la région C-terminale intracytoplasmique, de 1773 à 1921, importante pour l'inactivation du canal, est structurée en un domaine hélice-boucle-hélice, alors que la conformation tridimensionnelle de la région distale, de 1922 à 2016, semble moins organisée [98]. Ces auteurs ont généré par mutagenèse dirigée deux codon stop, S1885X et L1921X [98]. La génération de L1921X, résulte en une diminution de courant sodique sans affecter les propriétés biophysiques du canal. En revanche, la génération du codon stop dans la partie proximale, S1885X, qui conduit à la perte de la dernière hélice α , diminue le courant sodique et affecte la cinétique d'inactivation du canal [98]. De plus, une mutation tronquante L1821fs10 identifiée chez des patients atteints de dysfonction du nœud sinusal, résulte en une réduction du courant I_{Na} et une perte de fonction de l'inactivation menant à une augmentation du courant tardif I_{NaL} [269].

Nous avons identifié une délétion d'une base (c.5578delA) conduisant à un décalage du cadre de lecture et à une protéine tronquée, p.R1860fsX12, dans une famille atteinte d'une maladie du nœud sinusal et de troubles de la conduction atypiques. J'ai étudié les différentes caractéristiques biophysiques du courant sodique généré par ce canal mutant.

B/ Résultats

La mutation p.R1860GfsX12-Na_v1.5 a été identifiée dans une famille ayant une présentation phénotypique atypique. Le cas index a été diagnostiqué à l'âge de 13 ans avec une dysfonction sinusale sévère symptomatique (syncopes) avec des épisodes de bloc sino-atrial avec pauses, conduisant à la pose d'un stimulateur cardiaque. A partir de l'âge de 20 ans, elle a développé des épisodes de fibrillation atriale ainsi qu'un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré. Son père, également porteur de la mutation, présentait une forme asymptomatique de dysfonction sinusale détectée à l'âge de 27ans. Il a développé à l'âge de 42 ans un flutter atrial qui a été réduit par cardioversion. (Procédure médicale permettant de convertir un rythme cardiaque anormal en un rythme cardiaque normal grâce à des chocs électriques ou des agents pharmacologiques). Il a aussi développé des troubles de conduction avec un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré associé à un héli-bloc antérieur gauche. Son oncle paternel présentait quant à lui une dysfonction du nœud sinusal et un stimulateur cardiaque lui a été implanté vers l'âge de 30 ans. Néanmoins, son génotype n'a pas été établi. Sa sœur ne présentait aucune anomalie électrique ni morphologique et a été identifiée comme non porteuse de la mutation. Les échocardiographies des porteurs de mutations étaient normales excepté celle du père qui présentait une légère dilatation des oreillettes. De manière surprenante, aucun membre de la famille n'a présenté sur les ECG une anomalie du segment ST, évocatrice du SBr ni d'arythmie ventriculaire comme c'est le plus souvent le cas pour les mutations associées à une perte de fonction du canal Na_v1.5.

Tableau 5 : Propriétés biophysiques du canal R1860fsX12

Canal	Densité de courant à -20mV (pA/pF)	V _{1/2} Activation (mV)	V _{1/2} Inactivation (mV)	t _{1/2} à -20mV (mS)
Sauvage	262.27 ± 21	-44.24 ± 1.6	-84.4 ± 1.9	0.57 ± 0.08
1860fsX12	80.29 ± 16 ***	-37.11 ± 1 **	-108.9 ± 0.9 ***	1.01 ± 0.02 ***

p<0.001 ***, p<0.05 **

L'expression de ce canal dans des cellules HEK293 a montré une réduction de la densité du courant sodique au pic de 70% comparée à l'expression du canal sauvage (Figure 27A). De plus, plusieurs paramètres biophysiques se sont avérés être altérés. La courbe d'activation est décalée de 7.1mV vers des potentiels positifs (Figure 27B et Tableau 5). La courbe d'inactivation est décalée de 24,5 mV vers des potentiels négatifs (Figure 27B). Nous avons aussi observé un ralentissement de la vitesse d'inactivation du canal et le temps de demi-inactivation ($t_{1/2}$) est doublé (Figure 28 et Tableau 5). Enfin, le canal ne semble pas s'inactiver totalement, menant à un courant persistant, typique des mutations du canal sodique chez les patients atteints de SQT1 de type 3 (Figure 28) [272]. Néanmoins, la levée de l'inactivation de ce canal ne semble pas être affectée (Figure 27C). Ainsi, le canal sodique R1860GfsX12- $Na_v1.5$ présente une perte de fonction majeure affectant la densité de courant, l'activation et l'inactivation dépendante du potentiel, mais aussi un gain de fonction dû à un défaut d'inactivation menant à un ralentissement de la vitesse d'inactivation et la génération d'un courant lent persistant. Ces résultats sont en accord avec les effets des mutations S1885X et 1821fsX10 déjà rapportées, qui présentent une réduction de courant sodique, ainsi qu'un défaut majeur de fonctionnement de la porte d'inactivation [98, 269].

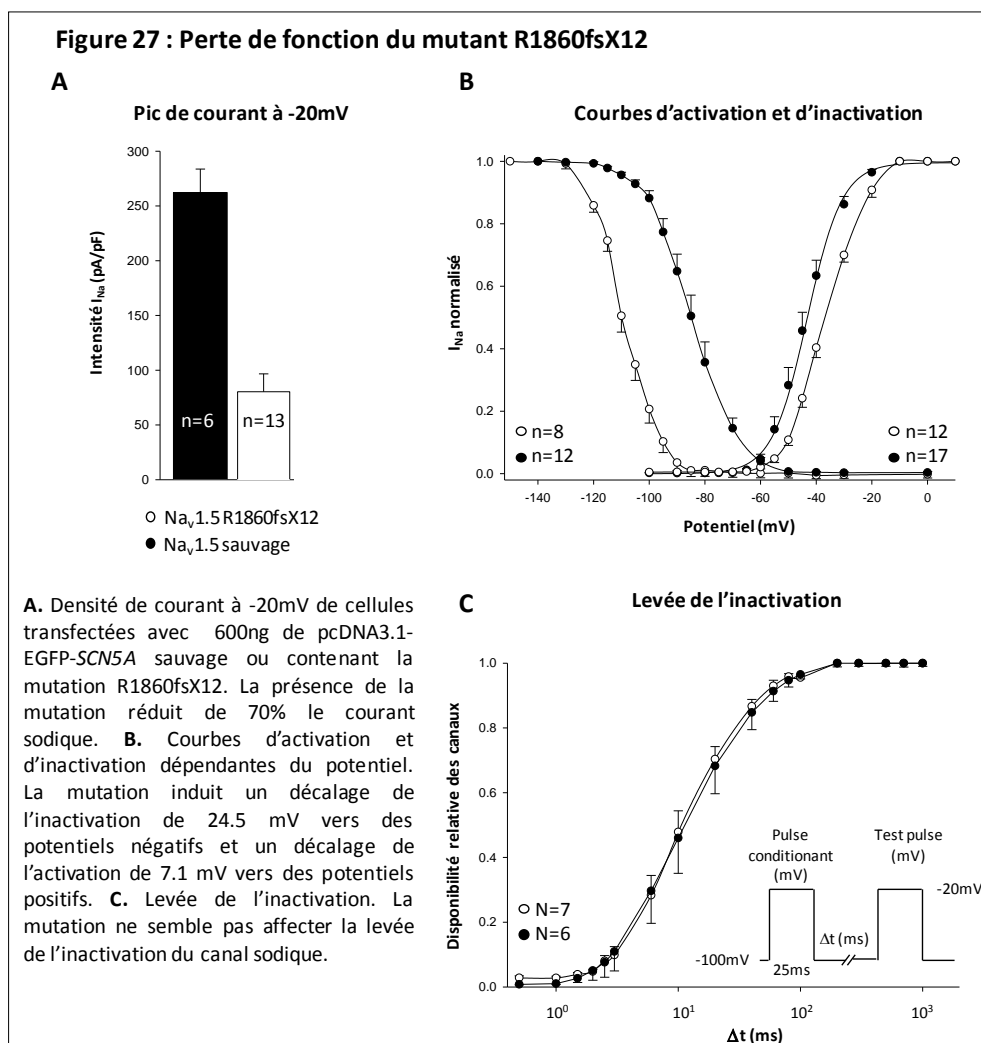
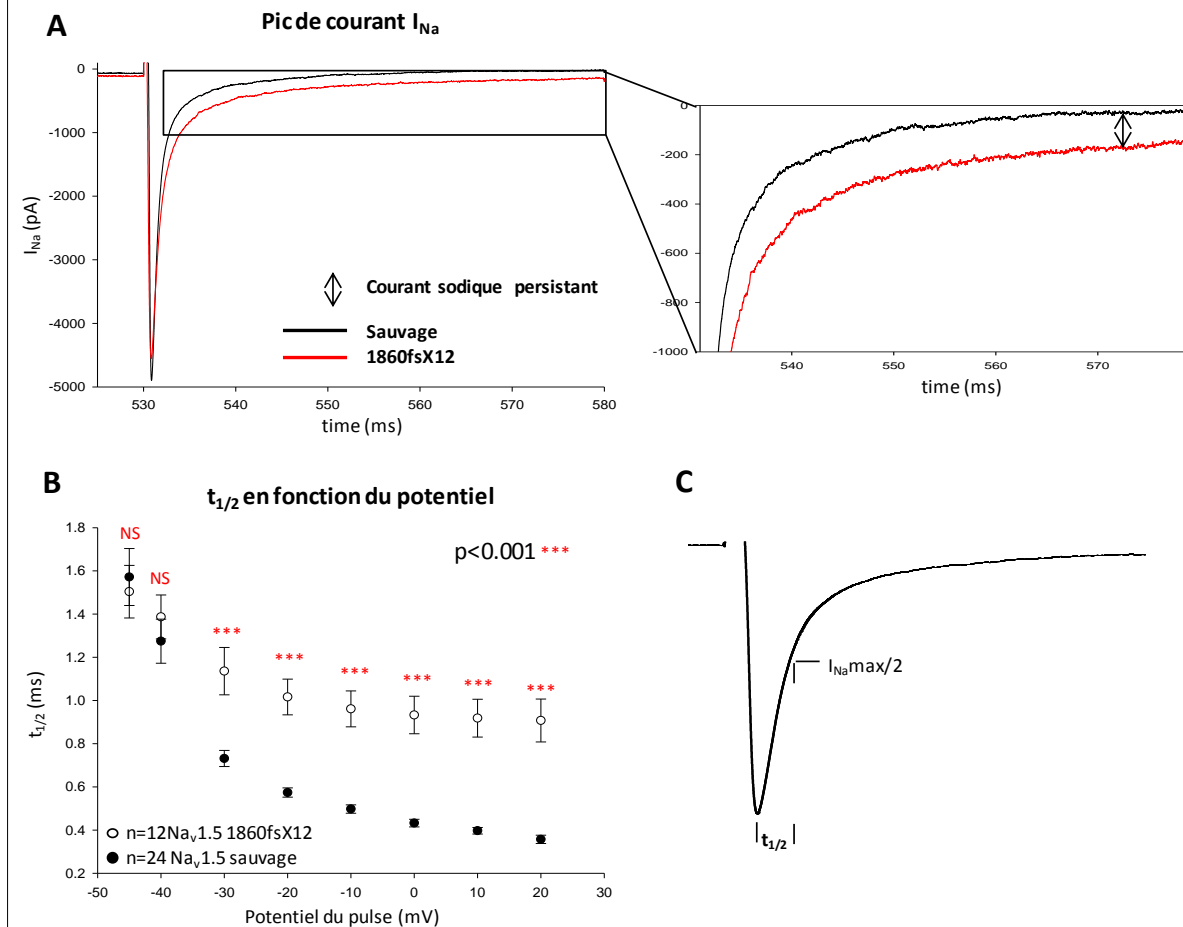


Figure 28 : Gain de fonction du mutant R1860fsX12



A. Exemple de courant persistant pour R1860fsX12 (pulse à -20 mV). **B.** Temps de demi-inactivation en fonction du potentiel de -45 à 20mV. Le temps de demi-inactivation est plus long pour le canal R1860fsX12 **C.** Tracé du courant sodique, le $t_{1/2}$ est le temps pour lequel la moitié du courant sodique est inactivée.

Discussion

I. Etude fonctionnelle de la partie N-terminale du canal sodique $Na_v1.5$

Des études fonctionnelles ont été réalisées pour de nombreuses mutations de $Na_v1.5$ par différents auteurs; elles ont apporté une meilleure compréhension du fonctionnement du canal sodique et des dysfonctions responsables de pathologies telles que le SBr.

Néanmoins, la partie N-terminale du canal sodique cardiaque, dont la fonction est à ce jour mal connue, a été très peu étudiée bien qu'elle apparaisse comme une région extrêmement conservée au cours de l'évolution chez les vertébrés et parmi les différents canaux sodiques humains. Des mutations de cette région ont été identifiées non seulement chez des patients atteints du SQTL, mais aussi de troubles de la conduction ou de SBr [21]. L'ensemble de ces données suggèrent que la partie N-terminale contribue au fonctionnement du canal sodique cardiaque.

Notre étude souligne pour la première fois l'importance fonctionnelle de cette région du canal sodique cardiaque par l'analyse d'une part, de deux canaux mutants (R104W et R121W- $Na_v1.5$) et d'autre part, du canal ΔN -ter- $Na_v1.5$ ne possédant pas de partie N-terminale. Les mutations faux-sens R104W et R121W abolissent le courant I_{Na} par rétention des mutants dans le réticulum endoplasmique, suivie d'une dégradation accrue comparée à celle de la protéine sauvage. La coexpression avec le canal sauvage des mutants retenus dans des compartiments intracellulaires tels que les mutants de la partie N-terminale et le mutant G1743R, montre un effet dominant-négatif, ainsi qu'un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs. A l'inverse, les canaux non fonctionnels, R878C- $Na_v1.5$ et ΔN -ter- $Na_v1.5$, sont capables d'atteindre la membrane plasmique mais ne présentent pas d'effet dominant-négatif. Par ailleurs, nous avons mis en évidence pour la première fois la capacité du canal mutant R878C- $Na_v1.5$ à restaurer partiellement le courant sodique de mutants retenus dans des compartiments intracellulaires. Ce phénomène implique un mécanisme de transcomplémentation et suggère une coopération des canaux sodiques.

Nous avons identifié la mutation R104W chez un patient asymptomatique de 33 ans atteint du syndrome de Brugada. Les anomalies observées sur son ECG comme sur celui de son père, mort subitement durant son sommeil à l'âge de 61 ans, sont typiques du SBr. La mutation R121W, quant à elle, a été identifiée chez des patients atteints de SBr [21] et chez des patients présentant une

dysfonction du nœud sinusal et des troubles de la conduction [39]. Dans cette dernière publication, les auteurs suggèrent que la mutation induit une perte de fonction associée à la dégradation de la protéine mutée. Cette région de la protéine possède des zones très conservées riches en arginine et en lysine. Aussi, il est très probable que la substitution de ces résidus hydrophiles chargés positivement en résidus hydrophobes non chargés tel que le tryptophane altère la structure tridimensionnelle de la région. Il est intéressant de noter que des substitutions similaires dans le canal sodique neuronal $\text{Na}_v1.1$ (R101W, R118S) sont responsables d'épilepsie infantile et du syndrome de Dravet [111]. Ces résultats, associés à la conservation de cette région, suggèrent une possible fonction de la partie N-terminale commune à plusieurs canaux $\text{Na}_v1.X$.

Nos résultats montrent que la présence de la partie N-terminale intracellulaire n'est pas nécessaire au canal pour atteindre la membrane plasmique. En effet, le canal sans cette région, $\Delta\text{Nter-Na}_v1.5$, est capable d'atteindre la membrane plasmique. En revanche, des mutations dans cette région, telles que R104W ou R121W, sont associées à une rétention de la majorité des protéines mutées dans le RE des cardiomyocytes de rat et à leur dégradation. Il est connu que le RE exerce une fonction de contrôle-qualité du bon repliement des protéines [273]. La perturbation de l'intégrité du RE qui peut être induite par l'accumulation de protéines mène au stress réticulaire. Ce dernier active des voies de signalisation en réponse à des protéines mal repliées et accumulées dans le RE (UPR pour Unfolded Protein Response) [274]. En condition de stress, ces voies de signalisation permettent l'épissage de l'ARNm du gène *XBP1* (pour X-box binding protein 1) permettant l'expression de la forme active du facteur de transcription XBP-1 régulant l'expression des gènes du stress cellulaire [275]. Néanmoins, la rétention des canaux mutants R104W et R121W ne semble pas activer la voie du stress réticulaire. Il est probable que les cellules utilisent le système ERAD (Endoplasmique Reticulum-Associated Degradation) pour supprimer rapidement du RE les protéines qui n'ont pas acquis une conformation normale leur permettant d'être transloquées vers le cytoplasme. Elles seraient alors dégradées par le système ubiquitine-protéasome [276, 277]. Cette dernière hypothèse est en accord avec nos résultats. En effet, l'incubation des cellules avec un inhibiteur de la sous-unité 26S de l'ubiquitine-protéasome, le MG132, inhibe la dégradation des mutants N-terminaux. Il est encore une fois intéressant de faire l'analogie avec un autre canal sodique neuronal, $\text{Na}_v1.6$, dans lequel la mutation N-terminale S21P est responsable *in vivo* de la rétention de la protéine mutée dans l'appareil de Golgi et de sa dégradation [112]. Dans cette étude, l'incubation des cellules à 30°C permet de restaurer partiellement la fonctionnalité de la protéine [112]. Néanmoins, dans notre cas, les conditions expérimentales connues pour restaurer la fonction de certains canaux mutants telles que le maintien des cellules pendant 24 heures à 30°C au lieu de

37°C, un traitement avec un anti-arythmique de classe IB, la mexilétine, ou encore la coexpression des canaux mutants avec la sous-unité β_1 , n'ont pas permis de restaurer la fonction des canaux mutés R104W et R121W. A l'inverse, Valdivia et coll. montrent que la fonction du canal muté G1743R, utilisé en tant que contrôle dans notre étude, est partiellement restaurée par l'incubation des cellules avec la mexilétine [267]. Ces résultats suggèrent des mécanismes de rétention différents. On notera par ailleurs que ce dernier mutant est capable de générer un très faible courant, montrant qu'une petite partie des canaux mutés atteignent malgré tout la membrane plasmique.

Aussi, on peut penser que les mutations R104W et R121W induisent un changement de conformation de la région N-terminale dévoilant un motif de rétention reconnu par le RE qui ne serait pas accessible sur la protéine sauvage. En effet, les motifs de rétention reconnus par le RE, tels que RXR, RRXX, KKXX, sont des motifs riches en acides aminés chargés positivement. Nous avons constaté que la région N-terminale des canaux sodiques est une région riche en arginines et lysines le plus souvent conservées dans la famille des canaux sodiques. De tels motifs pourraient se lier à des protéines COPI (Coated Protein complex I) appartenant aux vésicules de transport rétrograde, c'est-à-dire de l'appareil de Golgi vers le RE, et rejoindre la voie de dégradation [273]. Cette hypothèse est supportée par notre expérience montrant une colocalisation des mutants de la partie N-terminale avec le mutant CD4-KKXX, dont le motif KKXX se lie aux protéines COPI et qui est retenu dans le RE.

Un effet-dominant négatif de canaux dépendants du potentiel mutés sur des canaux sauvages a été décrit principalement pour des canaux potassiques, dont les sous-unités α présentent un seul domaine à 6 segments transmembranaires et forment des homotétramères [278]. Les canaux sodiques dépendants du potentiel formés de quatre domaines ne sont pas connus pour s'oligomériser. Aussi, l'effet dominant-négatif des mutants retenus dans le RE était assez inattendu. Keller et coll. avaient néanmoins déjà rapporté un effet similaire dans le cas du mutant L325R- $\text{Na}_v1.5$ qui lui aussi présentait un défaut de transport à la membrane [279]. Il est intéressant de noter que certaines mutations dans le gène *CACNA1A* ayant pour conséquences des substitutions dans la partie N-terminale de la sous-unité α du canal calcique dépendant du potentiel $\text{Ca}_v2.1$, dont la structure est similaire à celle des canaux sodiques, induisent aussi de forts effets dominant-négatifs et sont responsables d'ataxie [280, 281]. Les auteurs émettent l'hypothèse que les mutants interfèrent avec la biosynthèse et/ou le transport à la membrane du canal sauvage. Les résultats de notre étude sont en accord avec cette hypothèse. En effet, les mutants R104W, R121W, G1743R qui ont un défaut majeur de transport à la membrane, ont aussi un effet dominant-négatif sur le canal sauvage. A l'inverse, les canaux R878C et $\Delta\text{N-ter-}\text{Na}_v1.5$ qui ne sont pas dégradés et qui sont capables

d'atteindre la membrane, ne présentent pas d'effet dominant-négatif. Il est intéressant de noter que l'effet dominant-négatif ne semble pas être dû à une dégradation des canaux sauvages qui aurait pu être associée à celle des mutants, mais plutôt par l'inhibition de leur transport vers la membrane.

L'effet dominant négatif observé suggère une coopération directe ou indirecte des sous-unités α des canaux sodiques. Aussi, si un canal mutant présentant un défaut de transport est capable d'inhiber le transport du canal sauvage, à l'inverse un canal capable d'atteindre la membrane pourrait favoriser le transport de ces mutants. Nous avons donc utilisé le canal mutant non fonctionnel R878C qui est capable d'atteindre la membrane pour tester cette hypothèse [38, 268]. La coexpression du canal mutant R878C avec les mutants R104W, R121W, et G1743R restaure partiellement le courant sodique. Ce mécanisme de transcomplémentation, qui a été démontré pour le canal CFTR [282], n'a jamais été clairement établi pour les canaux $\text{Na}_v1.X$. Pourtant, une coopération des sous-unités α du canal sodique cardiaque avait déjà été suggérée par des études portant sur un polymorphisme fréquent de *SCN5A*, H558R [70]. En effet, le transport de certains mutants peut être restauré par la présence du polymorphisme H558R sur le deuxième allèle. Nos résultats suggèrent que le mutant R878C favorise le transport des canaux retenus dans la cellule. Il est possible qu'il dissimule les motifs de rétention dans le RE des canaux mutants, ou qu'il fournisse le motif nécessaire à leur sortie du RE. Néanmoins, il est également possible que l'association à la membrane de R878C et du peu de canaux R104W qui semble être présent à la membrane soit capable de générer un petit courant sodique. Dans tous les cas, ces résultats montrent que les canaux sodiques sont capables de coopérer. Récemment, Shinlapawittayatorn et coll. ont montré que la coexpression d'un peptide encadrant le polymorphisme H558R était capable à lui seul de restaurer le transport de canaux mutants, ce fragment de protéine permettant de favoriser le repliement du canal mutant [69]. Dans notre étude, la cotransfection du canal sauvage avec le peptide N-terminal du canal sodique cardiaque double la densité du courant sodique. Une explication possible est que le polypeptide pourrait entrer en compétition avec le canal dans un mécanisme de régulation du transport. Ainsi, le polypeptide jouerait un rôle de leurre facilitant la migration du canal vers la membrane. Ce mécanisme pourrait faire intervenir des partenaires de la partie N-terminale du canal sodique encore inconnus. Une deuxième hypothèse est que le fragment libre favoriserait l'ouverture du canal présent à la membrane. Néanmoins, des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre ces mécanismes.

Le phénomène de la complémentation reste grandement incompris. Dans notre étude, les mutants de la région N-terminale semblent être en proie à deux forces opposées. L'une, majoritaire,

entraîne la rétention des mutants et d'une partie des canaux sauvages par le système de contrôle-qualité de la cellule. L'autre, minoritaire, la transcomplémentation, permettrait à une fraction des canaux mutants d'être conduits à la membrane plasmique en présence d'un canal capable de l'atteindre.

Dans notre étude, les canaux mutants possèdent à la fois un défaut de transport à la membrane mais aussi un défaut d'activation dépendante du potentiel. Qu'en est-il des canaux mutants possédant un défaut de transport mais un gain de fonction dans l'ouverture du canal ? Le mutant T353I- $\text{Na}_v1.5$ présente un défaut de transport à la membrane, néanmoins un traitement à la mexilétine permet de restaurer le transport de ce canal à des niveaux proches de celui d'un canal normal. Le courant sodique restauré présente une augmentation du courant lent typique des canaux mutés retrouvés chez des patients atteints de SQTL [283]. Or nous avons noté dans notre cas que la transcomplémentation par le canal R878C était plus efficace que la mexilétine pour restaurer le courant I_{Na} du mutant G1743R- $\text{Na}_v1.5$. Ainsi, la transcomplémentation d'un canal possédant les propriétés similaires à celles du T353I- $\text{Na}_v1.5$ pourrait expliquer les conséquences phénotypiques de mutations du canal sodique identifiées aussi bien chez des patients atteints du SBr que chez des patients atteints du SQTL, parfois même au sein d'une même famille [20, 271, 284]. Il est possible que les mécanismes menant à l'une ou l'autre des pathologies soient le résultat d'un équilibre entre les deux forces citées dans le paragraphe ci-dessus (dominant-négatif et transcomplémentation). Ainsi, la présence de polymorphismes tels que H558R connu pour restaurer le transport à la membrane de certains canaux mutants et avoir un effet protecteur du SBr [70], mènerait dans ce cas plus facilement au SQTL. Enfin, il n'est pas exclu que des polymorphismes de certains partenaires puissent aussi jouer un rôle. Ceci complique l'étude des conséquences des mutations responsables du SBr, mais pourrait à terme expliquer la variabilité phénotypique associée aux mutations du canal sodique. Il est probable que ces phénomènes de dominance négative et de transcomplémentation associés à la présence de divers polymorphismes puissent être aussi la cause de la pénétrance partielle du SBr observée dans les familles atteintes.

Par ailleurs, ces expériences nous ont permis de révéler le rôle de la partie N-terminale dans l'ouverture et l'activation dépendante du potentiel du canal sodique. L'étude de l'implication de la charge positive dans la perte de fonction du canal R104W nous a menés à substituer l'arginine par un autre acide aminé positif, la lysine, et à générer le canal R104K- $\text{Na}_v1.5$. Nous avons montré que la présence de la charge positive ne prévient pas la dégradation déjà observée pour le canal R104W et le courant sodique est très fortement réduit mais pas aboli comme pour le canal R104W- $\text{Na}_v1.5$. Ces

résultats suggèrent que la perte de charge ne joue qu'un rôle partiel dans la perte de fonction du canal R104W et que la présence d'une arginine en position 104 est certainement très importante pour la conformation tridimensionnelle de cette région et l'interaction avec d'autres résidus. De plus, le courant restauré présente une activation décalée vers des potentiels positifs. On notera par ailleurs que le canal sodique privé de sa région N-terminale, $\Delta N_{\text{ter}}\text{-Na}_v1.5$, est capable d'atteindre la membrane plasmique mais est incapable de s'ouvrir. Ces résultats suggèrent que la partie N-terminale joue un rôle important dans l'ouverture et dans l'activation dépendante du potentiel du canal. Ces résultats sont à rapprocher des résultats de l'étude de Lee et coll. qui montrent, pour les canaux $\text{Na}_v1.2$ et $\text{Na}_v1.6$, l'importance de leur partie N-terminales respective dans leur activation dépendante du potentiel [114].

La coexpression de canaux mutants non fonctionnels avec le canal sauvage mène à un décalage de l'activation vers des potentiels plus positifs. De plus, les courants restaurés grâce à la transcomplémentation par le canal R878C, ou par incubation avec de la mexilétine, présentent un décalage de l'activation encore plus important, montrant que l'activation dépendante du potentiel est altérée. Ces résultats suggèrent que la présence des mutants altère le seuil d'activation dépendant du potentiel du canal sauvage. Le mécanisme par lequel le canal mutant est capable d'altérer l'activation du canal sauvage reste encore à préciser, néanmoins ces résultats sont en accord avec ceux d'Undrovinas et coll. qui montrent une étroite coopération des canaux sodiques par l'ouverture de deux ou trois canaux de façon simultanée, suggérant un mécanisme de synergie entre les canaux sodiques [285]. Il est important de noter que la coexpression du canal sauvage avec le canal $\Delta N_{\text{ter}}\text{-Na}_v1.5$ est la seule combinaison de canaux dans notre étude pour laquelle nous n'observons pas de décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs. Ce résultat suggère que l'altération de l'activation dépendante du potentiel du canal sodique sauvage par les mutants pourrait passer par leur région N-terminale.

D'un point de vue clinique, la mutation R104W à l'état hétérozygote chez le patient devrait être associée à une réduction de canaux sodiques sauvages à la membrane des cardiomyocytes, secondaire à un nouveau mécanisme physiopathologique que nous venons de décrire lié à la rétention et la dégradation des canaux mutants. De plus, le canal sauvage présent à la membrane devrait s'ouvrir à un potentiel de membrane plus positif. Ainsi, une différence de potentiel plus importante serait nécessaire pour dépolariser la cellule, retardant la propagation du potentiel d'action. Ces deux altérations sont considérées comme étant les substrats du SBr. Néanmoins, l'extrapolation de nos données aux patients reste difficile en raison des nombreux facteurs qui

régulent la fonction du canal sodique cardiaque. On notera que si $Na_v1.5$ reste le canal sodique majoritairement exprimé dans le myocarde, le rôle des autres canaux sodiques dans l'effet dominant-négatif ou dans la transcomplémentation reste encore à déterminer. Néanmoins, de telles mutations impliquant une diminution de canaux sodiques à la membrane associée à un décalage de l'activation pourraient avoir des conséquences plus sévères que des mutations menant à une seule haploinsuffisance.

II. Discussion préliminaire sur l'étude fonctionnelle du canal R1860GfsX12- $Na_v1.5$

La mutation R1860fsX12- $Na_v1.5$ de la région C-terminale est la mutation la plus distale identifiée jusqu'à présent dans le canal sodique cardiaque chez des patients atteints d'arythmies. Elle est située dans une partie structurée en hélice α de la région C-terminale intracytoplasmique, plus particulièrement à la fin du motif hélice-boucle-hélice (EF-Hand) sensible au calcium et en amont du motif IQ capable de lier la calmoduline [98, 99]. Ainsi, ce canal perd la capacité d'interagir avec la syntrophine, la SAP97, PTPHI, Nedd4 et la calmoduline. Néanmoins, il sera nécessaire de déterminer s'il est toujours capable d'interagir avec FHFIB, la mutation étant située dans la région d'interaction connue pour ce dernier. De plus, cette région joue un rôle important, d'une part dans l'inactivation rapide, grâce à différents facteurs tels que le calcium, la calmoduline, le motif IQ de $Na_v1.5$ [99], et d'autre part dans l'inactivation lente du canal grâce à son interaction avec le partenaire FHFIB [107-109]. En conclusion, cette mutation est située dans une région fonctionnelle critique, au cœur de la région de régulation des inactivations rapide et lente du canal [108].

La réduction de la densité de courant du canal mutant est certainement causée par la perte du nombre de canaux fonctionnels à la membrane. Ce résultat est en accord avec les résultats de Cormier et coll. qui ont montré que la génération d'un codon stop dans la partie C-terminale distale, L1921X, s'accompagnait d'une réduction de la densité du courant sodique [98]. Récemment, il a été montré que des partenaires possédant des motifs PDZ, la syntrophine et la SAP97, interagissaient avec les trois derniers acides aminés « SIV » de $Na_v1.5$ et contribuaient non seulement au transport du canal au sarcolemme mais aussi à sa localisation cellulaire (disques intercalaires vs membrane latérale) [203]. La protéine Nedd4, quant à elle, a été impliquée dans le recyclage du canal à la membrane [211].

Par ailleurs, Cormiers et coll. ont montré que la génération d'un codon stop prématuré situé dans la partie structurée proximale du canal, S1885X, altérait les paramètres de l'inactivation [98]. Pour le mutant R1860fsX12, nous avons observé que la courbe d'inactivation du canal était décalée de 24mV vers des potentiels plus négatifs menant à une perte de fonction importante du canal. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres groupes pour d'autres mutations tronquantes de la partie C-terminale du canal sodique cardiaque [98, 269]. Néanmoins, nous noterons quelques divergences. D'une part, le décalage de l'activation du mutant R1860GfsX12 est beaucoup plus important que celui retrouvé pour les canaux S1885X et L1821fs10 déjà décrits [98, 269]. D'autre part, la courbe d'inactivation du mutant L1821fs10 montre qu'il reste une fraction de canaux inactivables [269], à l'inverse de R1860GfsX12 et S1885X où 100% des canaux sont capables de s'inactiver. Ce résultat est très intéressant car la principale différence entre notre mutant et les deux autres semble être la perte du site d'interaction avec le partenaire FHF1B, connu depuis peu pour jouer un rôle dans l'inactivation lente du canal et la stabilisation de son état inactivé. Nous pouvons spéculer que les mutants R1860GfsX12 et S1885X se lient au partenaire FHF1B, ce qui leur permet d'entrer dans un état inactivé de manière stable, à l'inverse du canal L1821fs10 qui perdrait le site d'interaction avec FHF1B et serait donc incapable d'entrer dans un état inactivé stable permettant à une portion de canaux de se rouvrir [269]. On peut également s'interroger sur le rôle des 12 résidus résultant du décalage du cadre de lecture dans ces phénomènes.

Par ailleurs, les canaux tronqués, L1821fs10, R1860fsX12 et S1885X, présentent une réduction de la vitesse d'inactivation ainsi qu'un courant lent persistant. Ces résultats sont cohérents avec la perte d'une partie de la structure hélice-boucle-hélice et du domaine IQ capable de lier la calmoduline, qui sont tous deux connus pour jouer un rôle majeur dans l'inactivation du canal [99]. Ces derniers résultats ne sont pas à négliger pour l'interprétation des conséquences phénotypiques des mutations L1821fs10 et R1860fsX12. En effet, malgré la perte de fonction majeure du canal sodique cardiaque, nous n'avons noté aucune élévation du segment ST chez les patients porteurs de la mutation R1860GfsX12 mais principalement une dysfonction du nœud sinusal comme chez les patients porteurs de la mutation L1821fs10 [269]. La réduction du courant I_{Na} associée au décalage hyperpolarisant de l'inactivation implique une perte de fonction importante du canal et est très certainement compatible avec une diminution de la vitesse de propagation du potentiel d'action à l'origine des troubles de la conduction. Néanmoins, l'augmentation non négligeable de courant sodique persistant est classiquement retrouvée associée aux mutations « gain de fonction » identifiées chez des patients atteints de SQT [270, 272] et dans le cas du mutant L1821fs10 une

réactivation plus rapide traduisant une incapacité à rester dans un état stable inactivé [269]. Ces résultats expliqueraient l'absence d'élévation du segment ST notée chez ces patients, car ce type de gain de fonction empêcherait la perte de la phase plateau du potentiel d'action qui est une cause majeure de l'élévation du segment ST à l'ECG [29].

Enfin, il sera nécessaire de mimer l'état hétérozygote des patients par coexpression du canal sauvage avec le canal mutant R1860fsX12- $\text{Na}_v1.5$ afin d'évaluer l'effet de la présence du canal sauvage sur le courant I_{Na} . La coexpression de canaux mutants et de canaux sauvages n'a jamais été réalisée pour des mutations tronquantes de la partie C-terminale. En effet, le canal sauvage pourrait avoir un rôle important au vu des résultats de la précédente étude sur les effets de coopération entre canaux sodiques tant sur leur transport à la membrane, que sur leur ouverture. Le canal sodique sauvage serait-il capable de restaurer un nombre plus important de canaux mutants à la membrane ? Ou au contraire le canal mutant pourrait-il avoir un effet dominant-négatif sur le canal sauvage ? L'inactivation incomplète du canal mutant aurait-t-elle un effet sur celle du canal sauvage ? Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'effet de la sous-unité $\beta 1$ sur ce mutant. Serait-elle capable de restaurer une partie de sa fonction ou de moduler son inactivation ?

Conclusion

Ces travaux de thèse ont permis d'accroître les connaissances sur l'impact de mutations de la région N-terminale du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ et leur implication dans le syndrome de Brugada. Ils ont permis de démontrer que la région N-terminale, très conservée au cours de l'évolution, joue un rôle important dans la capacité d'ouverture du canal sodique cardiaque. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la présence de mutations dans cette région pouvait provoquer une rétention du canal dans le réticulum endoplasmique et altérer le transport à la membrane du canal sauvage menant à un effet dominant négatif. Nous avons également démontré la capacité du canal mutant R878C- $\text{Na}_v1.5$ à restaurer partiellement le courant sodique de mutants retenus dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène de transcomplémentation montre que les canaux sodiques sont capables de coopérer. La coopération des canaux sodiques avait déjà été suggérée par la capacité d'un canal sauvage porteur du polymorphisme H558R de restaurer partiellement le transport de certains mutants retenus dans des compartiments intracellulaires. Ce

polymorphisme pourrait ainsi avoir un effet protecteur chez des patients atteints du syndrome de Brugada.

Les phénomènes de dominance-négative et de transcomplémentation sont des concepts nouveaux dans le domaine des canaux sodiques. Les mécanismes sur lesquels ils reposent, s'ils suggèrent une coopération des sous-unités α , restent inconnus. Leur exploration ouvre de nouvelles perspectives tant pour la compréhension du fonctionnement du canal sodique cardiaque que pour l'étude des conséquences des mutations identifiées dans ce canal chez des patients atteints de troubles du rythme cardiaque héréditaires. Qu'ils concernent la partie N-terminale ou la région C-terminale de $\text{Na}_v1.5$, nos résultats soulignent la complexité du fonctionnement du canal sodique cardiaque et la diversité des phénotypes associés à ses altérations moléculaires.

Bibliographie

1. Soltysinska, E., et al., *Transmural expression of ion channels and transporters in human nondiseased and end-stage failing hearts*. Pflugers Arch, 2009. **459**(1): p. 11-23.
2. Michael, G., et al., *Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 491-9.
3. Abriel, H., *Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(1): p. 2-11.
4. Rayment, I., et al., *Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction*. Science, 1993. **261**(5117): p. 58-65.
5. Rayment, I., et al., *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor*. Science, 1993. **261**(5117): p. 50-8.
6. Smits, J.P., et al., *A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(6): p. 969-81.
7. Osher, H.L. and L. Wolff, *Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury*. Am J Med Sci, 1953. **226**(5): p. 541-5.
8. Martini, B., et al., *Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(2): p. 633.
9. Brugada, J., R. Brugada, and P. Brugada, *Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease*. Circulation, 1998. **97**(5): p. 457-60.
10. Brugada, P. and J. Brugada, *Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report*. J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(6): p. 1391-6.
11. Viskin, S., et al., *Prevalence of the Brugada sign in idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls*. Heart, 2000. **84**(1): p. 31-6.
12. Corrado, D., et al., *Right bundle branch block, right precordial st-segment elevation, and sudden death in young people*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 710-7.
13. Alings, M. and A. Wilde, *"Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 666-73.
14. Atarashi, H., et al., *Characteristics of patients with right bundle branch block and ST-segment elevation in right precordial leads. Idiopathic Ventricular Fibrillation Investigators*. Am J Cardiol, 1996. **78**(5): p. 581-3.
15. Priori, S.G., et al., *Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families*. Circulation, 2000. **102**(20): p. 2509-15.
16. Wilde, A.A., et al., *Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report*. Circulation, 2002. **106**(19): p. 2514-9.
17. Campuzano, O., R. Brugada, and A. Iglesias, *Genetics of Brugada syndrome*. Curr Opin Cardiol, 2010.
18. Chen, Q., et al., *Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 293-6.
19. Priori, S.G., et al., *Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1342-7.
20. Grant, A.O., et al., *Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1201-9.

21. Kapplinger, J.D., et al., *An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing*. Heart Rhythm, 2010. **7**(1): p. 33-46.
22. Campuzano, O., et al., *Genetics and cardiac channelopathies*. Genet Med, 2010. **12**(5): p. 260-7.
23. Amin, A.S., A. Asghari-Roodsari, and H.L. Tan, *Cardiac sodium channelopathies*. Pflugers Arch, 2009.
24. Wilde, A.A. and R. Brugada, *Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel*. Circ Res, 2011. **108**(7): p. 884-97.
25. Nademanee, K., et al., *Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium*. Circulation, 2011. **123**(12): p. 1270-9.
26. Probst, V., et al., *SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome*. Circ Cardiovasc Genet, 2009. **2**(6): p. 552-7.
27. Yan, G.X. and C. Antzelevitch, *Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation*. Circulation, 1999. **100**(15): p. 1660-6.
28. Yan, G.X. and C. Antzelevitch, *Cellular basis for the electrocardiographic J wave*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 372-9.
29. Di Diego, J.M., et al., *Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males*. Circulation, 2002. **106**(15): p. 2004-11.
30. Song, M., et al., *Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31883-90.
31. Tukkie, R., et al., *Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome*. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1272-7.
32. Shah, A.J., et al., *Regional substrate ablation abolishes brugada syndrome*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2011. **22**(11): p. 1290-1.
33. Gellens, M.E., et al., *Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 554-8.
34. Catterall, W.A., *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **26**(1): p. 13-25.
35. Wang, J., et al., *Analysis of four novel variants of Nav1.5/SCN5A cloned from the brain*. Neurosci Res, 2009. **64**(4): p. 339-47.
36. Liebeskind, B.J., D.M. Hillis, and H.H. Zakon, *Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9154-9.
37. Herfst, L.J., M.B. Rook, and H.J. Jongsma, *Trafficking and functional expression of cardiac Na⁺ channels*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(2): p. 185-93.
38. Gui, J., et al., *Multiple loss-of-function mechanisms contribute to SCN5A-related familial sick sinus syndrome*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10985.
39. Holst, A.G., et al., *Sick Sinus Syndrome, Progressive Cardiac Conduction Disease, Atrial Flutter and Ventricular Tachycardia Caused by a Novel SCN5A Mutation*. Cardiology, 2010. **115**(4): p. 311-316.
40. Ellinor, P.T., et al., *Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2008. **5**(1): p. 99-105.
41. Nattel, S., et al., *Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 425-56.
42. An, R.H., et al., *Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits*. Circ Res, 1998. **83**(2): p. 141-6.

43. Bennett, P.B., et al., *Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia*. Nature, 1995. **376**(6542): p. 683-5.
44. Ren, D., et al., *A prokaryotic voltage-gated sodium channel*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2372-5.
45. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
46. Leys, S.P., G.O. Mackie, and R.W. Meech, *Impulse conduction in a sponge*. J Exp Biol, 1999. **202 (Pt 9)**: p. 1139-50.
47. Hill, A.S., et al., *Ion channel clustering at the axon initial segment and node of Ranvier evolved sequentially in early chordates*. PLoS Genet, 2008. **4**(12): p. e1000317.
48. Zakon, H.H., M.C. Jost, and Y. Lu, *Expansion of voltage-dependent Na⁺ channel gene family in early tetrapods coincided with the emergence of terrestriality and increased brain complexity*. Mol Biol Evol, 2011. **28**(4): p. 1415-24.
49. Kulkarni, N.H., et al., *The DSC1 channel, encoded by the smi60E locus, contributes to odor-guided behavior in Drosophila melanogaster*. Genetics, 2002. **161**(4): p. 1507-16.
50. Zhou, W., et al., *A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene*. Neuron, 2004. **42**(1): p. 101-12.
51. Heinemann, S.H., et al., *Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations*. Nature, 1992. **356**(6368): p. 441-3.
52. Lipkind, G.M. and H.A. Fozzard, *Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue*. J Gen Physiol, 2008. **131**(6): p. 523-9.
53. Schlieff, T., et al., *Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain*. Eur Biophys J, 1996. **25**(2): p. 75-91.
54. Goldin, A.L., *Mechanisms of sodium channel inactivation*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(3): p. 284-90.
55. Sirota, F.L., P.G. Pascutti, and C. Anteneodo, *Molecular modeling and dynamics of the sodium channel inactivation gate*. Biophys J, 2002. **82**(3): p. 1207-15.
56. Anderson, P.A. and R.M. Greenberg, *Phylogeny of ion channels: clues to structure and function*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001. **129**(1): p. 17-28.
57. Goldin, A.L., *Evolution of voltage-gated Na(+) channels*. J Exp Biol, 2002. **205**(Pt 5): p. 575-84.
58. Plummer, N.W. and M.H. Meisler, *Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes*. Genomics, 1999. **57**(2): p. 323-31.
59. Hiyama, T.Y., et al., *Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing*. Nat Neurosci, 2002. **5**(6): p. 511-2.
60. Kelly, Z.L., et al., *HOX genes in ovarian cancer*. J Ovarian Res. **4**: p. 16.
61. Onkal, R., et al., *Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 716-26.
62. Brackenbury, W.J., M.B. Djamgoz, and L.L. Isom, *An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers*. Neuroscientist, 2008. **14**(6): p. 571-83.
63. Goldin, A.L., et al., *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 365-8.
64. Satin, J., et al., *A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1202-5.
65. Sivilotti, L., et al., *A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS*. FEBS Lett, 1997. **409**(1): p. 49-52.
66. Akopian, A.N., et al., *The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways*. Nat Neurosci, 1999. **2**(6): p. 541-8.

67. Dib-Hajj, S., et al., *NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties*. Trends Neurosci, 2002. **25**(5): p. 253-9.
68. Rook, M.B., et al., *Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression*. Cardiovasc Res, 2011. **93**(1): p. 12-23.
69. Shinlapawittayatorn, K., et al., *A Novel Strategy Using Cardiac Sodium Channel Polymorphic Fragments to Rescue Trafficking Deficient SCN5A Mutations*. Circ Cardiovasc Genet, 2011.
70. Poelzing, S., et al., *SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene*. Circulation, 2006. **114**(5): p. 368-76.
71. Viswanathan, P.C., D.W. Benson, and J.R. Balsler, *A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 341-6.
72. Shinlapawittayatorn, K., et al., *A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical defects of SCN5A mutations*. Heart Rhythm, 2011. **8**(3): p. 455-62.
73. Sato, C., et al., *The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1047-51.
74. Catterall, W.A., *A 3D view of sodium channels*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 988-9, 991.
75. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. Science, 1998. **280**(5360): p. 69-77.
76. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
77. Roden, D.M., et al., *Cardiac ion channels*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 431-75.
78. Noda, M., et al., *A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II*. FEBS Lett, 1989. **259**(1): p. 213-6.
79. Satin, J., et al., *The cloned cardiac Na channel alpha-subunit expressed in Xenopus oocytes show gating and blocking properties of native channels*. J Membr Biol, 1992. **130**(1): p. 11-22.
80. Stuhmer, W., et al., *Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel*. Nature, 1989. **339**(6226): p. 597-603.
81. Mitrovic, N., A.L. George, Jr., and R. Horn, *Independent versus coupled inactivation in sodium channels. Role of the domain 2 S4 segment*. J Gen Physiol, 1998. **111**(3): p. 451-62.
82. Kontis, K.J., A. Rounaghi, and A.L. Goldin, *Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains*. J Gen Physiol, 1997. **110**(4): p. 391-401.
83. Guy, H.R. and P. Seetharamulu, *Molecular model of the action potential sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(2): p. 508-12.
84. Yang, N., A.L. George, Jr., and R. Horn, *Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels*. Neuron, 1996. **16**(1): p. 113-22.
85. Yang, N. and R. Horn, *Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 213-8.
86. Cha, A., et al., *Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation*. Neuron, 1999. **22**(1): p. 73-87.
87. Patton, D.E., et al., *Amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10905-9.
88. West, J.W., et al., *A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10910-4.
89. Armstrong, C.M., *Sodium channels and gating currents*. Physiol Rev, 1981. **61**(3): p. 644-83.
90. Vassilev, P., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 8147-51.
91. Eaholtz, G., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide*. Neuron, 1994. **12**(5): p. 1041-8.

92. Rohl, C.A., et al., *Solution structure of the sodium channel inactivation gate*. *Biochemistry*, 1999. **38**(3): p. 855-61.
93. Tang, L., R.G. Kallen, and R. Horn, *Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker*. *J Gen Physiol*, 1996. **108**(2): p. 89-104.
94. McPhee, J.C., et al., *A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(2): p. 1121-9.
95. Tang, L., et al., *Glutamine substitution at alanine1649 in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel*. *J Gen Physiol*, 1998. **111**(5): p. 639-52.
96. McPhee, J.C., et al., *A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(20): p. 12025-34.
97. Chagot, B., et al., *Solution NMR structure of the C-terminal EF-hand domain of human cardiac sodium channel NaV1.5*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(10): p. 6436-45.
98. Cormier, J.W., et al., *Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 9233-41.
99. Shah, V.N., et al., *Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(10): p. 3592-7.
100. Motoike, H.K., et al., *The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain*. *J Gen Physiol*, 2004. **123**(2): p. 155-65.
101. Kim, J., et al., *Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 45004-12.
102. Sarhan, M.F., F. Van Petegem, and C.A. Ahern, *A double tyrosine motif in the cardiac sodium channel domain III-IV linker couples calcium-dependent calmodulin binding to inactivation gating*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(48): p. 33265-74.
103. Potet, F., et al., *Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(13): p. 8846-54.
104. Balsler, J.R., et al., *External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels*. *J Physiol*, 1996. **494 (Pt 2)**: p. 431-42.
105. Todt, H., et al., *Ultra-slow inactivation in mu1 Na⁺ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule*. *Biophys J*, 1999. **76**(3): p. 1335-45.
106. Vilin, Y.Y., et al., *Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels*. *Biophys J*, 1999. **77**(3): p. 1384-93.
107. Wang, C., E.G. Hoch, and G.S. Pitt, *Identification of novel interaction sites that determine specificity between fibroblast growth factor homologous factors and voltage-gated sodium channels*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(27): p. 24253-63.
108. Dover, K., et al., *Long-term inactivation particle for voltage-gated sodium channels*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 19): p. 3695-711.
109. Goldfarb, M., *Voltage-gated sodium channel-associated proteins and alternative mechanisms of inactivation and block*. *Cell Mol Life Sci*, 2011.
110. Lin, M.T., et al., *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*, 2008. **5**(11): p. 1567-74.
111. Lossin, C., *A catalog of SCN1A variants*. *Brain Dev*, 2009. **31**(2): p. 114-30.
112. Sharkey, L.M., et al., *The ataxia3 mutation in the N-terminal cytoplasmic domain of sodium channel Na(v)1.6 disrupts intracellular trafficking*. *J Neurosci*, 2009. **29**(9): p. 2733-41.
113. Han, C., et al., *Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 7): p. 1711-22.

114. Lee, A. and A.L. Goldin, *Role of the amino and carboxy termini in isoform-specific sodium channel variation*. J Physiol, 2008. **586**(16): p. 3917-26.
115. Poon, W.Y., et al., *Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11*. FEBS Lett, 2004. **558**(1-3): p. 114-8.
116. Hayes, M.J., et al., *Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 14157-64.
117. Rescher, U., et al., *Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 16): p. 3473-80.
118. Rescher, U. and V. Gerke, *S100A10/p11: family, friends and functions*. Pflugers Arch, 2008. **455**(4): p. 575-82.
119. Okuse, K., et al., *Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression*. Nature, 2002. **417**(6889): p. 653-6.
120. Heizmann, C.W., G. Fritz, and B.W. Schafer, *S100 proteins: structure, functions and pathology*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1356-68.
121. Camors, E., et al., *Association of annexin A5 with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and caveolin-3 in non-failing and failing human heart*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(1): p. 47-55.
122. Camors, E., V. Monceau, and D. Charlemagne, *Annexins and Ca²⁺ handling in the heart*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(4): p. 793-802.
123. Mishra, S., et al., *Interaction of annexin A6 with alpha actinin in cardiomyocytes*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 7.
124. Ahern, C.A., et al., *Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 991-8.
125. Tateyama, M., et al., *Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels*. Circulation, 2003. **107**(25): p. 3216-22.
126. Hilborn, M.D., R.R. Vaillancourt, and S.G. Rane, *Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway*. J Neurosci, 1998. **18**(2): p. 590-600.
127. Zhou, J., et al., *Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current*. Circ Res, 2002. **91**(6): p. 540-6.
128. Ratcliffe, C.F., et al., *A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta*. Nat Neurosci, 2000. **3**(5): p. 437-44.
129. Gavillet, B., et al., *Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin*. Circ Res, 2006. **99**(4): p. 407-14.
130. Stocker, P.J. and E.S. Bennett, *Differential sialylation modulates voltage-gated Na⁺ channel gating throughout the developing myocardium*. J Gen Physiol, 2006. **127**(3): p. 253-65.
131. van Bemmelen, M.X., et al., *Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 284-91.
132. Gasser, A., et al., *Two Nedd4-binding motifs underlie modulation of sodium channel Nav1.6 by p38 MAPK*. J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26149-61.
133. Valdivia, C.R., et al., *GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(4): p. H1446-52.
134. Berendt, F.J., K.S. Park, and J.S. Trimmer, *Multisite phosphorylation of voltage-gated sodium channel alpha subunits from rat brain*. J Proteome Res, 2010. **9**(4): p. 1976-84.
135. Cantrell, A.R. and W.A. Catterall, *Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(6): p. 397-407.

136. Schmidt, J.W. and W.A. Catterall, *Palmitoylation, sulfation, and glycosylation of the alpha subunit of the sodium channel. Role of post-translational modifications in channel assembly.* J Biol Chem, 1987. **262**(28): p. 13713-23.
137. Montpetit, M.L., et al., *Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16517-22.
138. Beltran-Alvarez, P., S. Pagans, and R. Brugada, *The cardiac sodium channel is post-translationally modified by arginine methylation.* J Proteome Res, 2011. **10**(8): p. 3712-9.
139. Wang, D.W., et al., *Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome.* Circulation, 2007. **115**(3): p. 368-76.
140. Isom, L.L., et al., *Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif.* Cell, 1995. **83**(3): p. 433-42.
141. Shapiro, L., et al., *Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin.* Neuron, 1996. **17**(3): p. 435-49.
142. Meadows, L.S. and L.L. Isom, *Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes.* Cardiovasc Res, 2005. **67**(3): p. 448-58.
143. Isom, L.L., *Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary.* Neuroscientist, 2001. **7**(1): p. 42-54.
144. Patino, G.A. and L.L. Isom, *Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease.* Neurosci Lett, 2010. **486**(2): p. 53-9.
145. Brackenbury, W.J. and L.L. Isom, *Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family.* Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 53.
146. Kim, D.Y., et al., *BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 755-64.
147. Kim, D.Y., et al., *Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration.* J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23251-61.
148. McCormick, K.A., et al., *Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit.* J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3954-62.
149. Malhotra, J.D., et al., *Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin.* J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26681-8.
150. Malhotra, J.D., et al., *Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes.* J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40748-54.
151. Qin, N., et al., *Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit.* Eur J Biochem, 2003. **270**(23): p. 4762-70.
152. Qu, Y., et al., *Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in Xenopus oocytes by beta 1 subunits.* J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25696-701.
153. Dhar Malhotra, J., et al., *Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes.* Circulation, 2001. **103**(9): p. 1303-10.
154. Zimmer, T., et al., *The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum.* J Membr Biol, 2002. **186**(1): p. 13-21.
155. Makita, N., P.B. Bennett, and A.L. George, Jr., *Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels.* J Neurosci, 1996. **16**(22): p. 7117-27.
156. McCormick, K.A., et al., *The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating.* J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32638-46.

157. Bezzina, C.R., et al., *Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system.* *Circ Res*, 2003. **92**(2): p. 159-68.
158. Fahmi, A.I., et al., *The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart.* *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 3): p. 693-700.
159. Herfst, L.J., et al., *Na⁺ channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects.* *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(5): p. 549-57.
160. Valdivia, C.R., T. Nagatomo, and J.C. Makielski, *Late Na currents affected by alpha subunit isoform and beta1 subunit co-expression in HEK293 cells.* *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(8): p. 1029-39.
161. Ko, S.H., et al., *Modulation of Na(v)1.5 by beta1-- and beta3-subunit co-expression in mammalian cells.* *Pflugers Arch*, 2005. **449**(4): p. 403-12.
162. Maltsev, V.A., J.W. Kyle, and A. Undrovinas, *Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit.* *J Physiol Sci*, 2009. **59**(3): p. 217-25.
163. Mishra, S., et al., *Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(4): p. H1596-605.
164. Spanpanato, J., et al., *A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction.* *J Neurosci*, 2004. **24**(44): p. 10022-34.
165. Casini, S., et al., *Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating.* *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(4): p. 691-700.
166. Lopez-Santiago, L.F., et al., *Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals.* *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 636-47.
167. Watanabe, H., et al., *Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation.* *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009. **2**(3): p. 268-75.
168. Watanabe, H., et al., *Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans.* *J Clin Invest*, 2008. **118**(6): p. 2260-8.
169. Koopmann, T.T., C.R. Bezzina, and A.A. Wilde, *Voltage-gated sodium channels: action players with many faces.* *Ann Med*, 2006. **38**(7): p. 472-82.
170. Remme, C.A., A.A. Wilde, and C.R. Bezzina, *Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations.* *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(3): p. 78-87.
171. Maier, S.K., et al., *Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart.* *Circulation*, 2004. **109**(11): p. 1421-7.
172. Zimmer, T. and K. Benndorf, *The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit.* *J Gen Physiol*, 2002. **120**(6): p. 887-95.
173. Zimmer, T. and K. Benndorf, *The intracellular domain of the beta 2 subunit modulates the gating of cardiac Na v 1.5 channels.* *Biophys J*, 2007. **92**(11): p. 3885-92.
174. Johnson, D. and E.S. Bennett, *Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating.* *J Biol Chem*, 2006. **281**(36): p. 25875-81.
175. Valdivia, C.R., et al., *Loss of Function Mutation of the SCN3B-Encoded Sodium Channel {beta}3 Subunit Associated with a Case of Idiopathic Ventricular Fibrillation.* *Cardiovasc Res*, 2009.
176. Hakim, P., et al., *Effects of flecainide and quinidine on action potential and ventricular arrhythmogenic properties in Scn3b knockout mice.* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010. **37**(8): p. 782-9.
177. Wang, P., et al., *Functional dominant-negative mutation of sodium channel subunit gene SCN3B associated with atrial fibrillation in a Chinese GeneID population.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **398**(1): p. 98-104.

178. Hu, D., et al., *A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009. **2**(3): p. 270-8.
179. Tan, B.H., et al., *Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel beta subunits*. *Heart Rhythm*, 2010. **7**(6): p. 771-8.
180. Olesen, M.S., et al., *Mutations in sodium channel beta-subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2011. **89**(4): p. 786-93.
181. Remme, C.A., et al., *Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy*. *Circ Res*, 2009. **104**(11): p. 1283-92.
182. Yu, F.H., et al., *Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2*. *J Neurosci*, 2003. **23**(20): p. 7577-85.
183. Medeiros-Domingo, A., et al., *SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome*. *Circulation*, 2007. **116**(2): p. 134-42.
184. Remme, C.A., et al., *Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD*. *Circulation*, 2006. **114**(24): p. 2584-94.
185. George, A.L., Jr., *Genetic modulation of impaired cardiac conduction: sodium channel beta4 subunit missing in action*. *Circ Res*, 2009. **104**(11): p. 1238-9.
186. Goldenberg, I. and A.J. Moss, *Long QT syndrome*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(24): p. 2291-300.
187. Hedley, P.L., et al., *The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update*. *Hum Mutat*, 2009. **30**(9): p. 1256-66.
188. Cunha, S.R. and P.J. Mohler, *Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(1): p. 22-9.
189. Mohler, P.J., et al., *Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death*. *Nature*, 2003. **421**(6923): p. 634-9.
190. Mohler, P.J., et al., *Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes*. *Circulation*, 2007. **115**(4): p. 432-41.
191. Chauhan, V.S., et al., *Abnormal cardiac Na(+) channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice*. *Circ Res*, 2000. **86**(4): p. 441-7.
192. Lemaillet, G., B. Walker, and S. Lambert, *Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 27333-9.
193. Mohler, P.J., et al., *Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(50): p. 17533-8.
194. Lowe, J.S., et al., *Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(1): p. 173-86.
195. Abriel, H. and R.S. Kass, *Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins*. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. **15**(1): p. 35-40.
196. Williams, J.C., et al., *The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(33): p. 23341-8.
197. Oceandy, D., et al., *Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b*. *Circulation*, 2007. **115**(4): p. 483-92.
198. Ahern, G.P., et al., *Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(37): p. 28810-5.
199. Ueda, K., et al., *Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(27): p. 9355-60.

200. Wu, G., et al., *alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2008. **1**(3): p. 193-201.
201. Cheng, J., et al., *Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009. **2**(6): p. 667-76.
202. Albesa, M., et al., *Regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by utrophin in dystrophin-deficient mice*. *Cardiovasc Res*, 2011. **89**(2): p. 320-8.
203. Petitprez, S., et al., *SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes*. *Circ Res*, 2011. **108**(3): p. 294-304.
204. El-Haou, S., et al., *Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2009. **104**(6): p. 758-69.
205. Marfatia, K.A., et al., *Identification and characterization of the human MOG1 gene*. *Gene*, 2001. **266**(1-2): p. 45-56.
206. Kattygnarath, D., et al., *MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011. **4**(3): p. 261-8.
207. Olesen, M.S., et al., *A novel nonsense variant in Nav1.5 cofactor MOG1 eliminates its sodium current increasing effect and may increase the risk of arrhythmias*. *Can J Cardiol*, 2011. **27**(4): p. 523 e17-23.
208. Ziane, R., et al., *Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction*. *Biochemistry*, 2010. **49**(1): p. 166-78.
209. Jespersen, T., et al., *The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family*. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(1): p. 64-74.
210. Rotin, D. and S. Kumar, *Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(6): p. 398-409.
211. Rougier, J.S., et al., *Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(3): p. C692-701.
212. Fotia, A.B., et al., *Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 28930-5.
213. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. *Science*, 2007. **315**(5809): p. 201-5.
214. Kang, L., et al., *Bepidil up-regulates cardiac Na⁺ channels as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity*. *Br J Pharmacol*, 2009. **157**(3): p. 404-14.
215. Couchonnal, L.F. and M.E. Anderson, *The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease*. *Physiology (Bethesda)*, 2008. **23**: p. 151-9.
216. Maier, L.S., *Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 486-96.
217. Maier, L.S. and D.M. Bers, *Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(8): p. 919-39.
218. Wagner, S., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3127-38.
219. Yoon, J.Y., et al., *Constitutive CaMKII activity regulates Na⁺ channel in rat ventricular myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **47**(4): p. 475-84.
220. Kass, R.S., *The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 1986-9.
221. Maltsev, V.A., et al., *Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(4): p. H1597-608.

222. Davis, M.J., et al., *Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(5): p. H1835-62.
223. Hartmann, H.A., et al., *Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating*. Circ Res, 1994. **75**(1): p. 114-22.
224. Jespersen, T., et al., *Cardiac sodium channel Na(v)1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(4): p. 1455-62.
225. Morrison, D.K., *The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(1): p. 16-23.
226. Mrowiec, T. and B. Schwappach, *14-3-3 proteins in membrane protein transport*. Biol Chem, 2006. **387**(9): p. 1227-36.
227. Allouis, M., et al., *14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1538-46.
228. Williams, T.M. and M.P. Lisanti, *The Caveolin genes: from cell biology to medicine*. Ann Med, 2004. **36**(8): p. 584-95.
229. Vatta, M., et al., *Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome*. Circulation, 2006. **114**(20): p. 2104-12.
230. Cronk, L.B., et al., *Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3*. Heart Rhythm, 2007. **4**(2): p. 161-6.
231. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
232. Yarbrough, T.L., et al., *Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 443-9.
233. Shibata, E.F., et al., *Autonomic regulation of voltage-gated cardiac ion channels*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006. **17 Suppl 1**: p. S34-S42.
234. Lu, T., et al., *Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit*. J Physiol, 1999. **518 (Pt 2)**: p. 371-84.
235. Palygin, O.A., J.M. Pettus, and E.F. Shibata, *Regulation of caveolar cardiac sodium current by a single Galpha histidine residue*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(4): p. H1693-9.
236. Liu, C., S.D. Dib-Hajj, and S.G. Waxman, *Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN)*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18925-33.
237. Olsen, S.K., et al., *Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34226-36.
238. Liu, C.J., et al., *Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1029-36.
239. Goetz, R., et al., *Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17883-96.
240. Wehrens, X.H., et al., *Arrhythmogenic mechanism of an LQT-3 mutation of the human heart Na(+) channel alpha-subunit: A computational analysis*. Circulation, 2000. **102**(5): p. 584-90.
241. Chin, D. and A.R. Means, *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(8): p. 322-8.
242. Saimi, Y. and C. Kung, *Calmodulin as an ion channel subunit*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 289-311.
243. Pitt, G.S., *Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(4): p. 641-7.
244. Herzog, R.I., et al., *Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties*. J Neurosci, 2003. **23**(23): p. 8261-70.

245. Deschenes, I., et al., *Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin*. *Circ Res*, 2002. **90**(4): p. E49-57.
246. Tan, H.L., et al., *A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability*. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 442-7.
247. Young, K.A. and J.H. Caldwell, *Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin*. *J Physiol*, 2005. **565**(Pt 2): p. 349-70.
248. Wingo, T.L., et al., *An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(3): p. 219-25.
249. Miloushev, V.Z., et al., *Solution structure of the Nav1.2 C-terminal EF-hand domain*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(10): p. 6446-54.
250. Casini, S., et al., *Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(1): p. 72-81.
251. Brisson, D., et al., *Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?* *Bioessays*, 2001. **23**(6): p. 534-42.
252. Weiss, R., et al., *Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3*. *Circulation*, 2002. **105**(6): p. 707-13.
253. London, B., et al., *Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na+ current and causes inherited arrhythmias*. *Circulation*, 2007. **116**(20): p. 2260-8.
254. Van Norstrand, D.W., et al., *Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome*. *Circulation*, 2007. **116**(20): p. 2253-9.
255. Murray, K.T., et al., *Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na+ channel*. *Circ Res*, 1997. **80**(3): p. 370-6.
256. Faulkner, G., G. Lanfranchi, and G. Valle, *Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle*. *IUBMB Life*, 2001. **51**(5): p. 275-82.
257. Hayashi, T., et al., *Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(11): p. 2192-201.
258. Mues, A., et al., *Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin*. *FEBS Lett*, 1998. **428**(1-2): p. 111-4.
259. Furukawa, T., et al., *Specific interaction of the potassium channel beta-subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system*. *J Mol Biol*, 2001. **313**(4): p. 775-84.
260. Mazzone, A., et al., *A mutation in telethonin alters Nav1.5 function*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(24): p. 16537-44.
261. Gerull, B., et al., *Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. *Nat Genet*, 2004. **36**(11): p. 1162-4.
262. Sato, P.Y., et al., *Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2009. **105**(6): p. 523-6.
263. Oxford, E.M., et al., *Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells*. *Circ Res*, 2007. **101**(7): p. 703-11.
264. Napolitano, C., I. Rivolta, and S.G. Priori, *Cardiac sodium channel diseases*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. **41**(4): p. 439-44.
265. Stevenson, S.A., et al., *High-resolution en-face visualization of the cardiomyocyte plasma membrane reveals distinctive distributions of spectrin and dystrophin*. *Eur J Cell Biol*, 2005. **84**(12): p. 961-71.
266. Singh, A.K., et al., *Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(3): p. 540-50.

267. Valdivia, C.R., et al., *A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p. 53-62.
268. Zhang, Y., et al., *Correlations between clinical and physiological consequences of the novel mutation R878C in a highly conserved pore residue in the cardiac Na⁺ channel*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **194**(4): p. 311-23.
269. Tan, B.H., et al., *A novel C-terminal truncation SCN5A mutation from a patient with sick sinus syndrome, conduction disorder and ventricular tachycardia*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(3): p. 409-17.
270. Wang, Q., et al., *SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome*. Cell, 1995. **80**(5): p. 805-11.
271. Bezzina, C., et al., *A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes*. Circ Res, 1999. **85**(12): p. 1206-13.
272. Valdivia, C.R., et al., *A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(2): p. 279-89.
273. Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen, *ER stress and neurodegenerative diseases*. Cell Death Differ, 2006. **13**(3): p. 385-92.
274. Brewer, J.W. and L.M. Hendershot, *Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 23-9.
275. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
276. Brodsky, J.L. and C.M. Scott, *Tipping the delicate balance: defining how proteasome maturation affects the degradation of a substrate for autophagy and endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD)*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 623-5.
277. Rock, K.L., et al., *Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules*. Cell, 1994. **78**(5): p. 761-71.
278. Chouabe, C., et al., *Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias*. EMBO J, 1997. **16**(17): p. 5472-9.
279. Keller, D.I., et al., *Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(3): p. 510-9.
280. Jouvenceau, A., et al., *Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel*. Lancet, 2001. **358**(9284): p. 801-7.
281. Mezghrani, A., et al., *A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels*. J Neurosci, 2008. **28**(17): p. 4501-11.
282. Cormet-Boyaka, E., et al., *Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8221-6.
283. Pfahnl, A.E., et al., *A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome*. Heart Rhythm, 2007. **4**(1): p. 46-53.
284. Makita, N., *Phenotypic overlap of cardiac sodium channelopathies: individual-specific or mutation-specific?* Circ J, 2009. **73**(5): p. 810-7.
285. Undrovinas, A.I., I.A. Fleidervish, and J.C. Makielski, *Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine*. Circ Res, 1992. **71**(5): p. 1231-41.

Résumé

Le syndrome de Brugada (SBr) est une arythmie cardiaque héréditaire à transmission dominante et pénétrance partielle. Cette pathologie est caractérisée par une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites (V1 à V3) sur l'ECG et un risque important de mort subite et de syncope par fibrillation ventriculaire. Le gène *SCN5A*, qui code le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$, est le gène majoritairement mis en cause dans le SBr. Le canal sodique cardiaque est responsable de l'initiation et de la propagation du potentiel d'action dans le myocarde. Ainsi, la perte de fonction de ce canal joue un rôle important dans le SBr. Nous avons identifié la mutation R104W chez un patient atteint du SBr. Cette dernière se situe dans la partie N-terminale intracellulaire du canal, une région très conservée chez les vertébrés. Il existe de nombreuses mutations identifiées dans cette région du canal mais très peu d'analyses fonctionnelles ont été réalisées. La fonction de cette région reste inconnue. L'ensemble de ce travail permet de mieux comprendre les conséquences de mutations de la région N-terminale dans le SBr et le rôle de cette dernière dans la fonction du canal $Na_v1.5$.

Les caractéristiques biophysiques du courant sodique généré par les différents canaux $Na_v1.5$ mutants ou sauvages ont été mesurées par la technique du patch-clamp sur cellule entière dans des cellules HEK293. L'expression des protéines totales ou présentes à la membrane plasmique a été déterminée par les techniques de western blot et de biotinylation dans des cellules HEK293. Enfin, la localisation subcellulaire des différents canaux a été réalisée par immunocytochimie dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés.

La mutation R104W abolit le courant sodique et provoque la rétention du canal mutant dans le réticulum endoplasmique puis sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. De plus, ce canal exerce un effet dominant négatif sur le canal sauvage. Dans le but de comprendre le rôle de la partie N-terminale dans la fonction de la protéine, nous avons supprimé cette région du canal dans la construction $\Delta N_{ter}-Na_v1.5$. Bien qu'il ne soit pas fonctionnel, ce dernier s'est avéré normalement exprimé à la membrane sans être dégradé. Par ailleurs, il n'exerce pas d'effet dominant négatif sur le canal sauvage. Afin d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'effet dominant négatif exercé par le canal R104W- $Na_v1.5$, nous avons étudié deux autres mutations abolissant le courant sodique répertoriées dans la littérature. Il s'est avéré que les mutants étudiés présentaient un défaut de transport à la membrane et exerçaient aussi un effet dominant négatif sur le canal sauvage, réduisant de 80% la densité de courant I_{Na} . A l'inverse, le canal mutant R878C- $Na_v1.5$, capable d'atteindre la membrane mais incapable de s'ouvrir, n'exerce pas d'effet dominant négatif, tout comme le canal $\Delta N_{ter}-Na_v1.5$. Ainsi, des mutants retenus dans le réticulum endoplasmique pourraient altérer le transport du canal sauvage. Ces résultats suggèrent une coopération des canaux $Na_v1.5$. Afin de valider cette hypothèse, nous avons coexprimé le canal R878C- $Na_v1.5$ avec les trois mutants retenus dans le réticulum endoplasmique. Cette coexpression donne naissance à un courant sodique d'environ 8% du courant sauvage et met en évidence un mécanisme de transcomplémentation des canaux sodiques cardiaques.

En conclusion, si la présence de la région N-terminale du canal sodique cardiaque n'est pas indispensable à son transport à la membrane, elle semble être nécessaire à son ouverture. Des mutations faux-sens dans cette région sont capables d'abolir le courant sodique par un mécanisme de rétention du canal mutant dans le réticulum endoplasmique et d'avoir un effet dominant-négatif sur le canal sauvage en altérant son transport. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un mécanisme de transcomplémentation montrant que les sous-unités α du canal sodique cardiaque sont capables de coopérer.