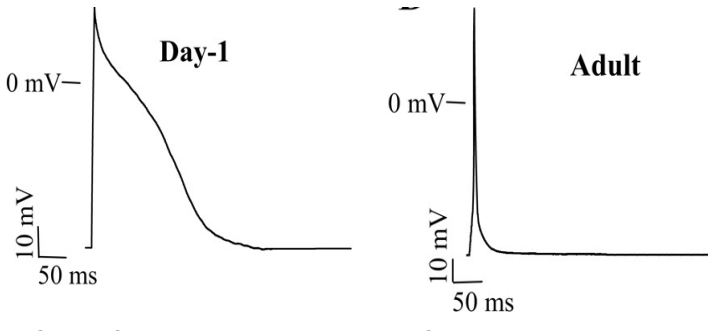
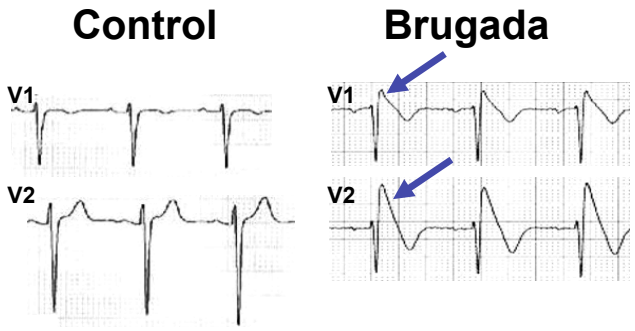
# Les canaux ioniques dans les arythmies cardiaques

## I. L'électrophorèse cardiaque : Complexe et Modulable

On va parler d'activité électrique. L'activité électrique n'est pas stable, elle est soumise à des variations. Soit de façon physiologique : différente en fonction des zones dans le cœur, de l'âge, des hormones…

Variation du PA entre le nouveau né rat et le rat adulte



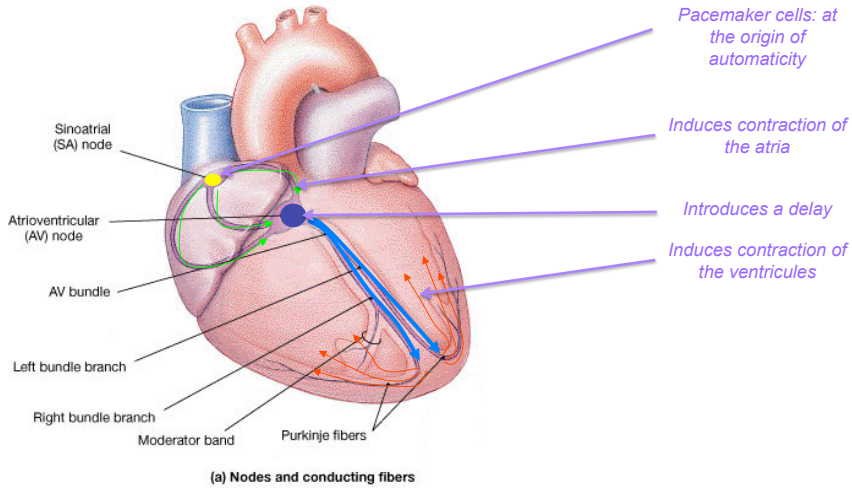



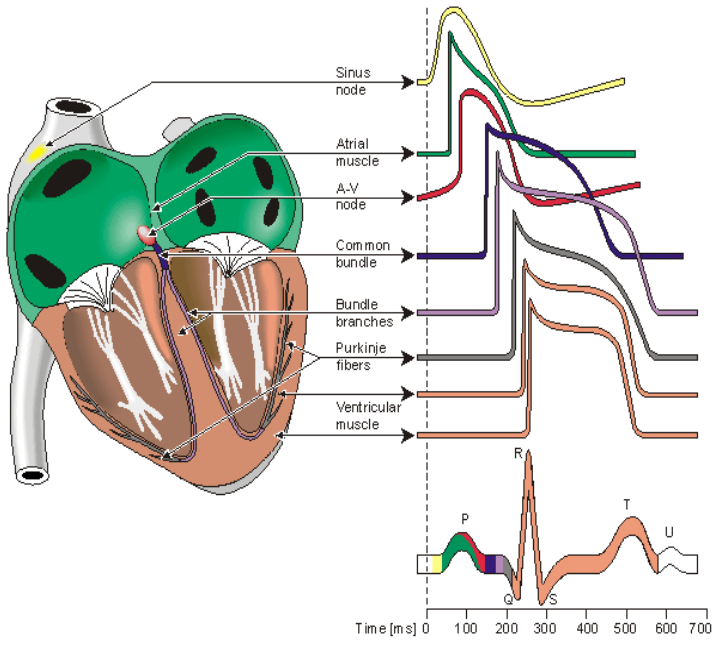

Soit de façon pathologique : des mutations dans les canaux, sous l'effet de médicaments…

Ici le syndrome de Brugada (on revoit plus loin).
Modification de l'activité électrique suite à une mutation qui induit un allongement du potentiel d'action qui peut entrainer jusqu'à la mort subite.

### 1. Conduction du signal électrique dans le cœur

Le PA est généré par le Nœud sinusal ➔ transmis aux Oreillettes (contractions) ➔ arrive dans le Nœud auriculo-ventriculaire (ralenti) ➔ transmis dans la Paroi ventriculaire (contraction)
Bien distinguer dans le cœur l'activité électrique et l'activité contractile. Deux fonctions liées mais différentes. Il n'y a évidemment pas d'activité contractile sans activité électrique.



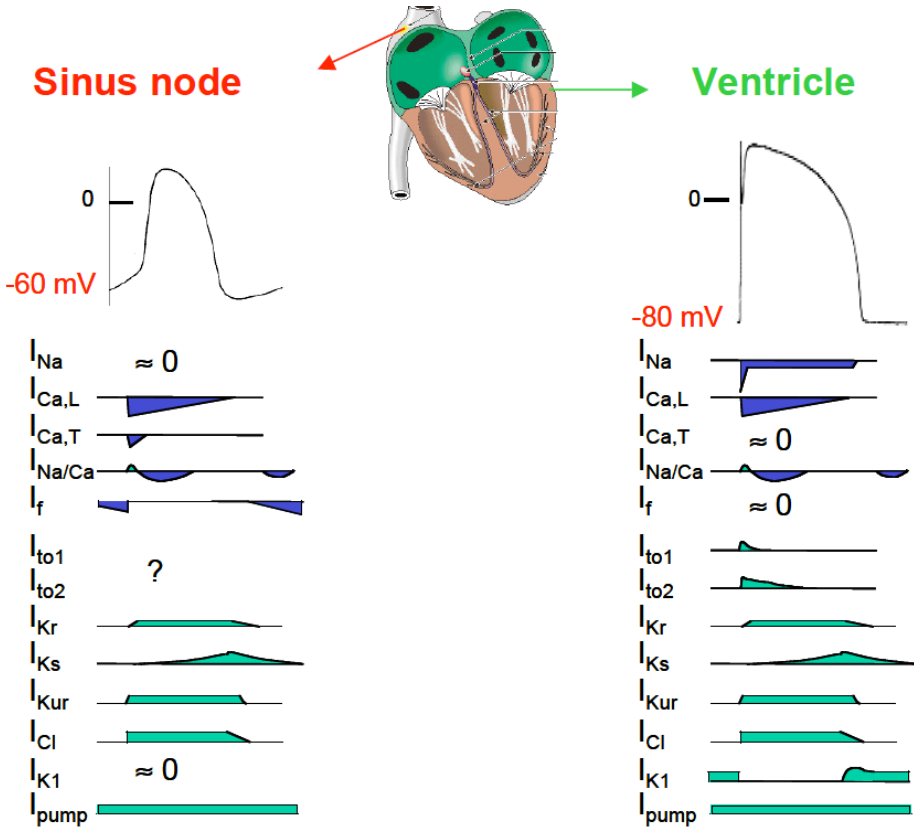




### 2. Enregistrement des potentiels d'actions dans les différentes parties du cœur.

Voici les formes des PA en fonction des zones du cœur.
L'ECG est la résultante des potentiels d'actions dans toutes les parties du cœur.
Chaque compartiment a une activité spécifique ; c'est fondamental pour le bon fonctionnement du cœur.

## 3. Comment explique t on les potentiels d'action différents ?

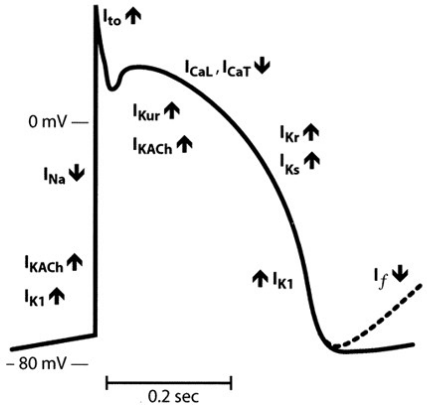
L'activité électrique est la résultante de l'ouverture et de la fermeture de canaux. Les potentiels d'actions sont différents car ce ne sont pas les mêmes courants qui interviennent pour générer les potentiels d'action dans les différents compartiments du cœur.



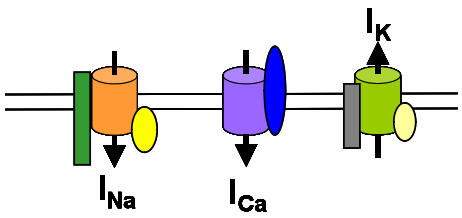

Vous voyez par exemple ici que dans le nœud sinusal il n'y a pas de courant sodique alors qu'il y en a un dans le ventricule. Ce courant sodique qui donne la dépolarisation extrêmement rapide au début du PA du ventricule que l'on ne retrouve pas dans le nœud sinusal.
A l'inverse on peut voir que le courant If ('funny current') est présent dans le nœud sinusal alors qu'il ne l'est pas dans le ventricule. Il est responsable de la pente de dépolarisation diastolique en fin de potentiel d'action du nœud sinusal. Il est responsable du signal automatique.

## 4. En résumé :

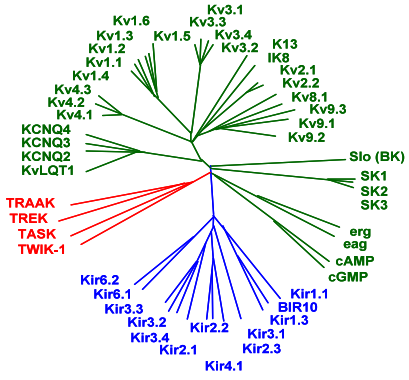
***1/ La fonction électrique résulte de l'activité de nombreux courants***




***2/ Un courant est généré par une famille de canaux ioniques et sous-unités auxiliaires***




***3/ Une famille de canaux est codée par de nombreux gènes***




1. Ici sont représentés tous les courants qui interviennent à chaque phase
3. Une petite idée des gènes qui ont été clonés rien que pour l'expression des canaux potassiques
Ce qui veut dire que derrière cette activité électrique il y a un nombre incroyable de protéines qui interviennent.

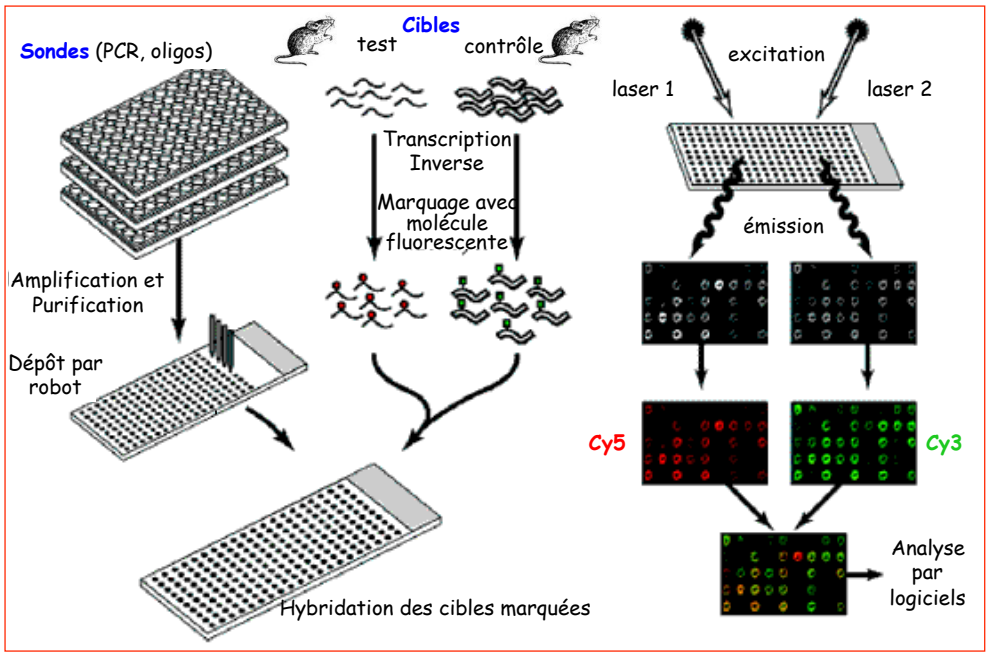
**Objectif : Déterminer le rôle et l'organisation de l'expression des canaux ioniques dans le signal électrique physiologique et physiopathologique du cœur.**
**C'est à dire : comment l'activité de ces canaux est régulée ? Et, quelle importance ils ont dans l'activité électrique ? = Y a t il une corrélation et une conséquences entre l'expression des canaux et l'activité életrique ?**

## II. Stratégie

On cherche à mettre en relation l'aspect moléculaire et fonctionnel. C'est à dire : que se passe-t-il au niveau moléculaire quand on a un trouble du rythme ? On a utilisé des techniques de génomique : l'idée est de pouvoir voir l'ensemble des gènes qui codent pour les canaux et voir qu'est ce qui se passe dans différentes conditions.

### 1. Développer des outils génomiques dédiés aux canaux ioniques :

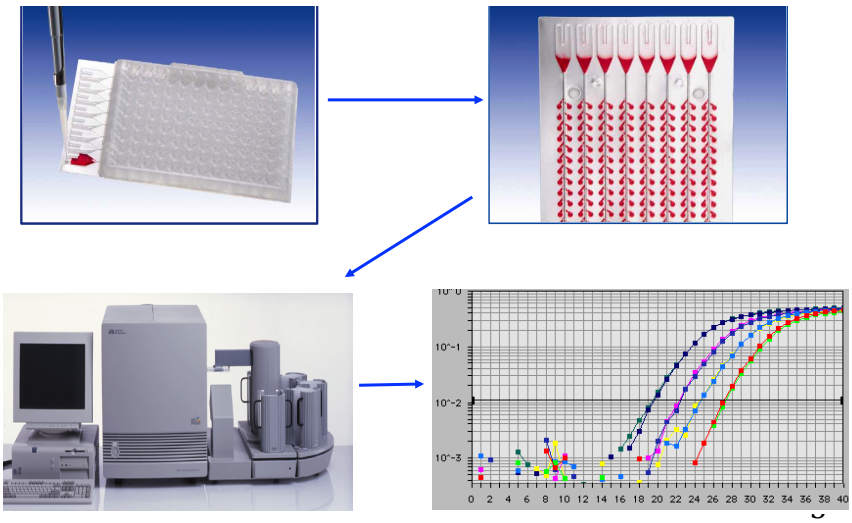
a. Technique des puces à ADN spécifiques des canaux ioniques



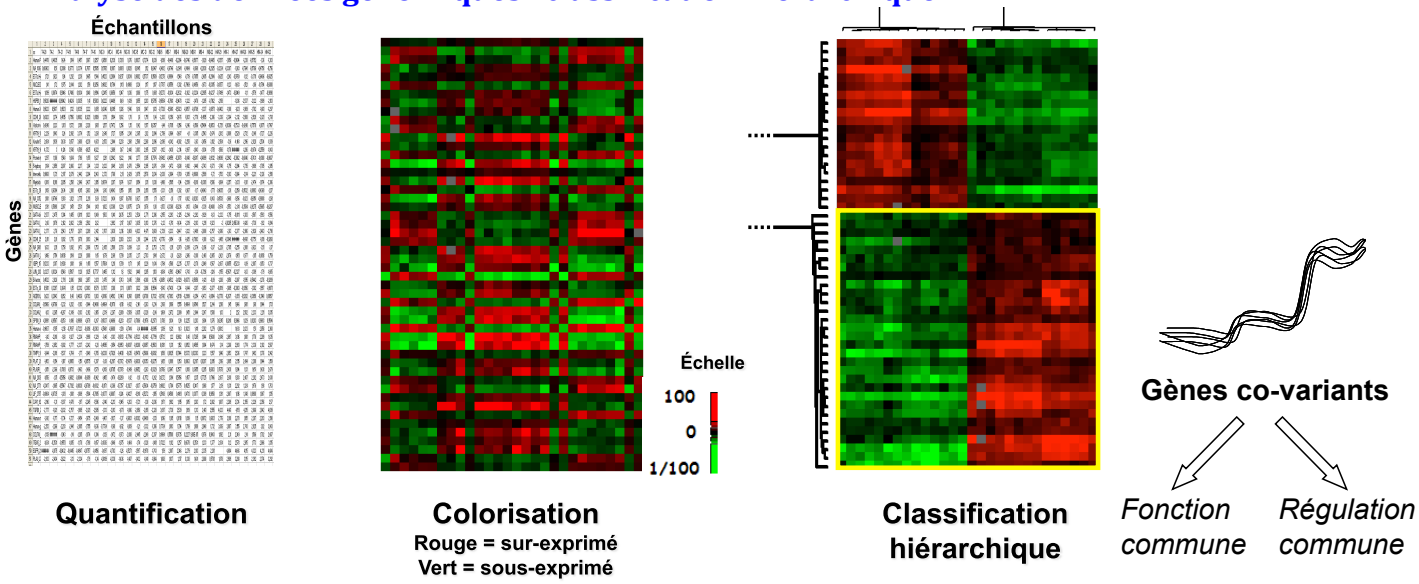

On ne s'est pas intéressé à l'ensemble des gènes du génome, uniquement ceux des canaux ioniques car leurs gènes sont faiblement exprimés en comparaisons des autres protéines.

b. Technique TaqMan Low Density Arrays ou RtPCR à haut débit

Plaque de 384 puits, contenant des primers et une sonde spécifique d'un gène.
Principe de la PCR, beaucoup plus sensible et nécessitant moins de matériel. On charge les gros puits de cDNA, par centrifugation ils vont migrer via les micro capillaires dans les petits puits où vont se réaliser les réactions de PCR dans un thermo-cycleur qui va nous permettre de suivre l'augmentation d'expression de chaque gène au fur et à mesure de chaque cycle de PCR.



## 2. Analyse des données génomiques : classification hiérarchique

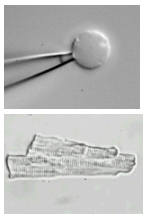


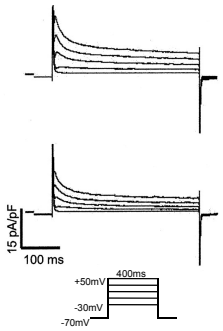

| | | |
|---|---|---|
| On a nos données brut d'expression des gènes, on va classer les échantillons dans nos colonnes (patient 1, 2, 3..), en horizontal on a l'expression de nos gènes (gène 1, 2, 3…). | Le logiciel va analyser dans quels échantillons les gènes sont le moins exprimé (vert -) et le plus exprimé (rouge +) chez le patient. | Le logiciel réorganise les données ensuite : regroupement des patients et des gènes par homologie de profil génomique. |

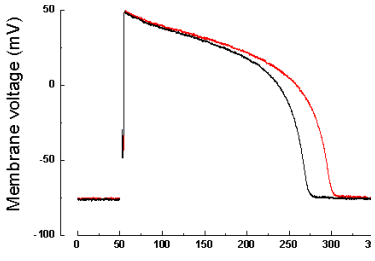
Sur le plan horizontal on peut en déduire que les gènes mitoyens ont : soit une fonction proche soit un régulation commune.
Sur le plan vertical on peut dire que deux profils de patients ont été révélés.

## 3. Corréler l'expression transcriptionnelle au phénotype électro physiologique

Jusque maintenant on était au niveau moléculaire, évidemment si ces variations d'expressions ne se traduisent pas au niveau du phénotypes, elles ne nous intéressent pas. La suite de notre démarche est de vérifier justement si elles se traduisent.

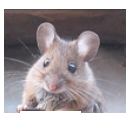




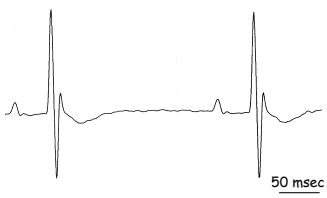




Au niveau des cellules on peut mesurer l'activité des canaux par la technique du patch-clamp

Au niveau in vivo : mesure d'ECG
Aparté : le cœur de la souris bat à 600 bts/min donc il faut prendre en compte ce paramètre lors des études.





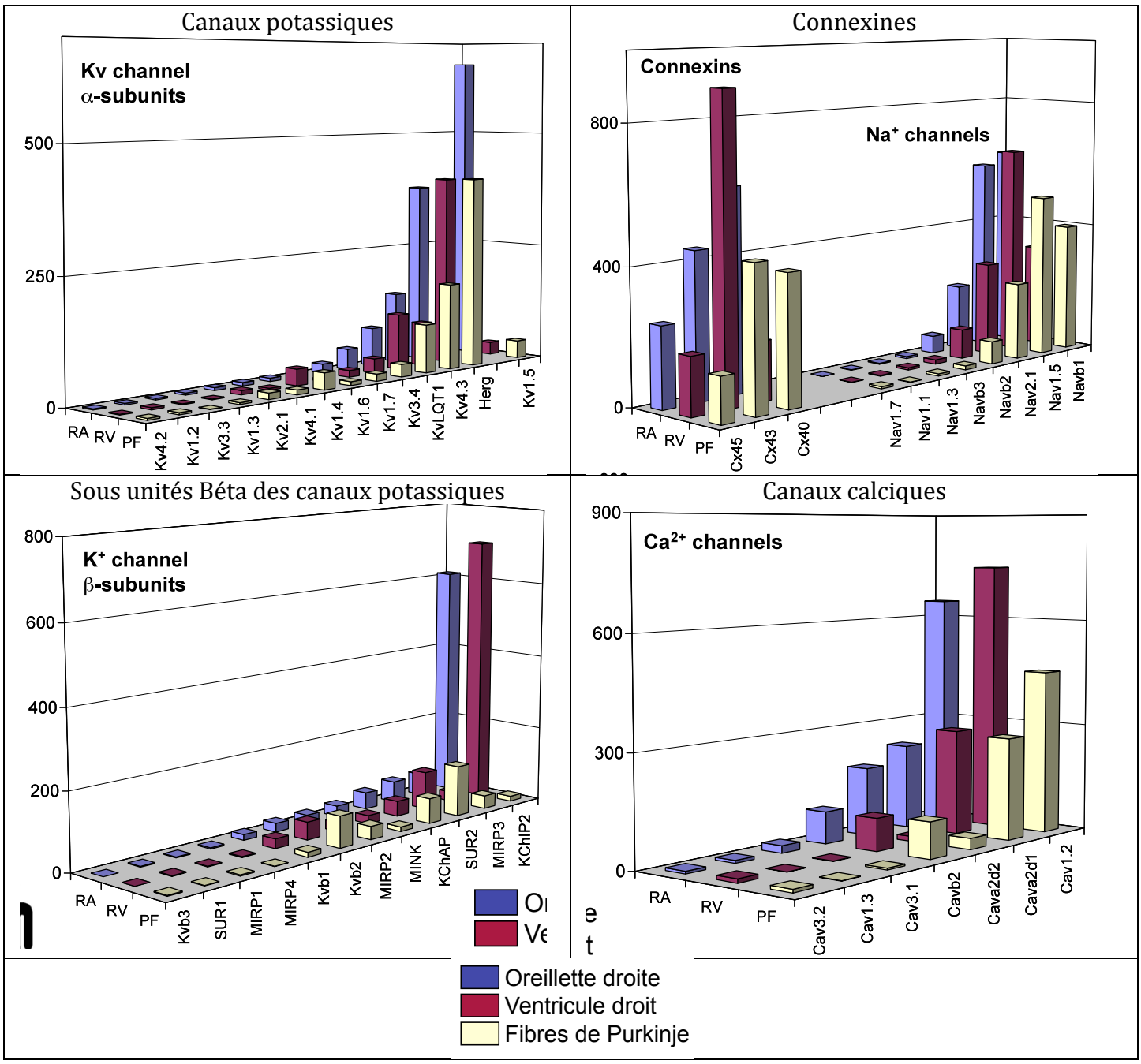
# III. Applications

## Application 1 : l'hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur et la génomique des canaux ioniques

Est ce que l'hétérogénéité électrique physiologique est due à une expression différente des canaux ioniques dans les différents compartiments ?

On a prélevé différentes parties du cœur et on a analysé l'expression des canaux ioniques.

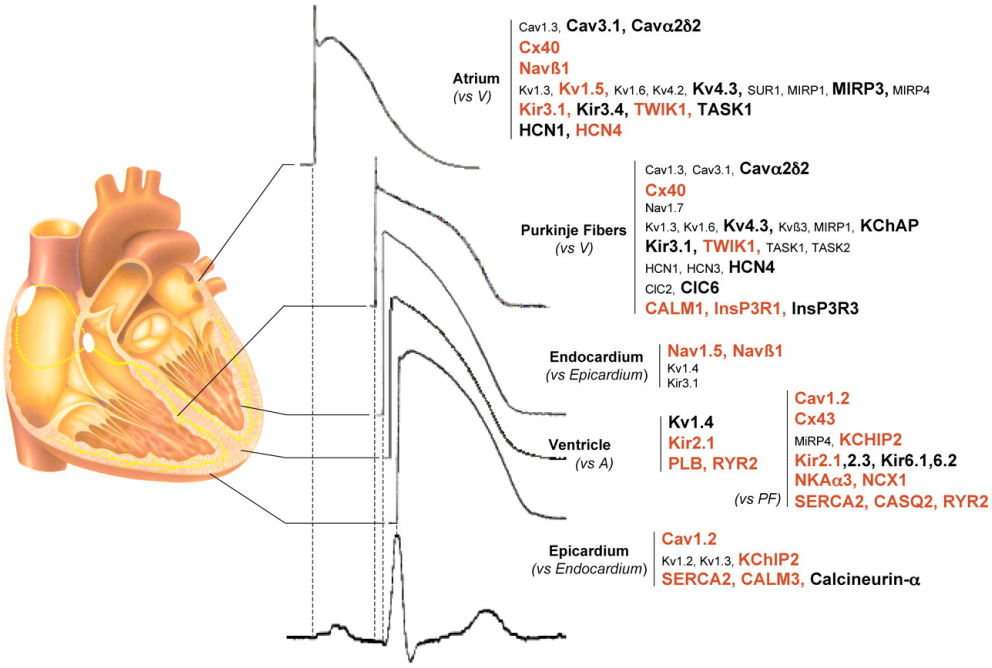
1ère difficulté : il faut avoir des tissus sains pour déterminer la répartition physiologique, donc il faut prélever sur cœur sain. Collaboration avec des hôpitaux hongrois qui ne savent pas greffer le cœur entier et qui font parvenir aux laboratoires français le reste du cœur ; les cœurs sains peuvent aussi être des pièces qui n'ont pas pu être greffés au dernier moment. (osef)




On peut voir qu'au sein d'une même famille il y a des gènes qui sont faiblement exprimés ou très fortement exprimés. La répartition n'est pas homogène.

Il y a des gènes qui sont spécifiques à des régions :

Très grosse application au niveau pharmacologique afin de déterminer les cibles et les effets secondaires. Lorsqu'on va créer et/ou prescrire un médicament pour agir sur un canal on va connaître la répartition de ses effets.
Si on regarde l'ensemble des gènes exprimés dans chaque région par une cartographie, on remarque que chaque région a sa spécificité.



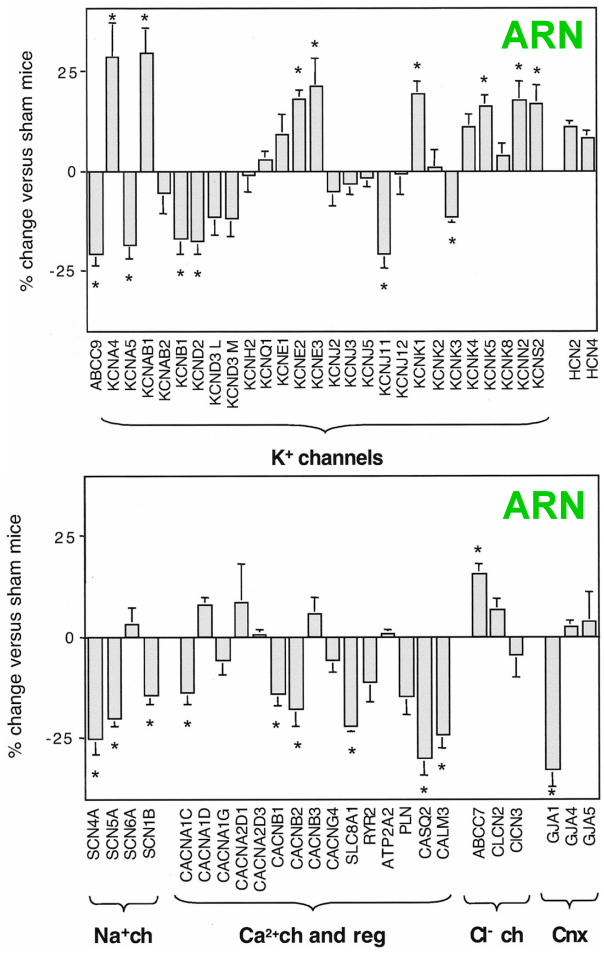

Faiblement exprimés
**Correctement exprimés**
**Fortement exprimés**

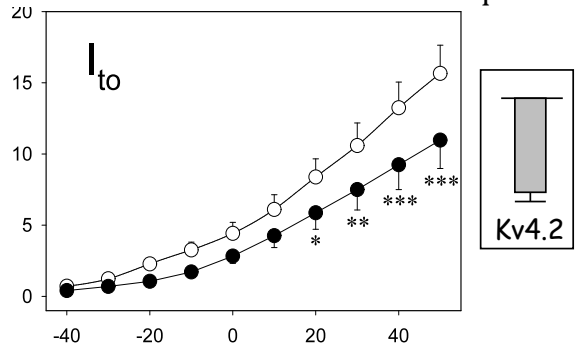
Une oreillette ne dispose pas de la même répartition de canaux électriques qu'un ventricule ; c'est ce qui est fondamental pour l'hétérogénéité électrique du cœur.

## Application 2 : l'antiarythmique amiodarone et la génomique des canaux ioniques

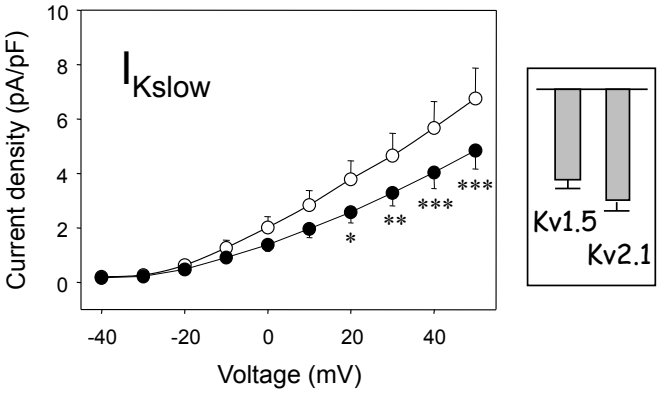
L'amiodarone a un profil pharmaceutique particulier. Il a été développé pour bloquer les canaux potassiques mais il ne bloque pas que ceux ci (également les sodiques et calciques). L'amiodarone comporte également une molécule d'iode donc elle va se fixer sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes donc agir sur des facteurs de transcription qui vont modifier l'expression de certains gènes. On sait que le blocage des canaux ne suffit pas à expliquer l'effet de l'amiodarone. On sait également que l'amiodarone induit une hypo ou un hyperthyroïdie.

L'effet pharmacologique de l'amiodarone qui consiste à allonger le PA ne passerait-il pas par la modification de l'expression des canaux ioniques ?
On a traité de façon chronique des souris en montant graduellement la quantité d'amiodarone. On a ensuite regardé le taux de variations des expressions génomiques. ➔
A 0 : les taux des différents canaux chez les souris contrôle.
Les diagrammes représentent les variations en plus ou en moins par type de canal chez les souris traitées par amiodarone.
On voit que le traitement à l'amiodarone modifie grandement l'expression des gènes.
On a regardé si cela avait des conséquences fonctionnelles.



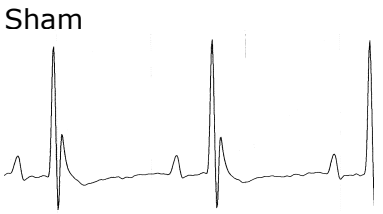



A titre d'exemple : le canal Kv4.2 était sous exprimé chez les souris traitées à l'amiodarone. On a donc mesuré le courant Ito chez ces souris et on a en effet remarqué une diminution du courant passant par ces canaux. Il y a donc ici une conséquence fonctionnelle.

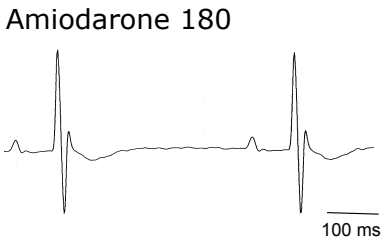



De la même manière il y avait les canaux potassiques Kv1.5 et Kv2.1 qui étaient sous exprimés dans le traitement à l'amiodarone, qui génèrent le courant Ikslow. On remarque également une diminution du courant.

Il y a donc bien une conséquence fonctionnelle suite à la modification moléculaire.




Ici on a la représentation ECG chez une souris de contrôle et chez une souris traitée. On remarque également une nette modification de l'ECG. On peut voir qu'il y a un net allongement de l'intervalle R-R.

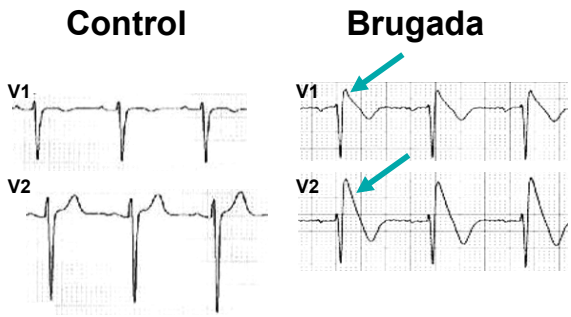



On a montré grâce à cette étude qu'un antiarythmiques pouvait agir sur l'expression des gènes. Cela peut être utilisé maintenant pour trouver d'autres antiarythmiques qui n'interviennent pas uniquement sur le blocage fonctionnel mais qui peuvent également jouer sur l'expression.

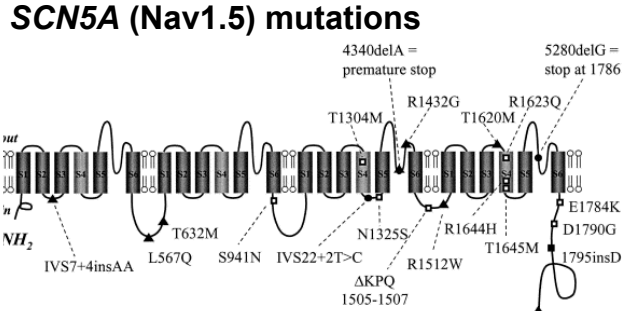
On s'est rendu compte au décours de ces études qu'une molécule qui « touchait un peu à tout » sera certainement plus efficace et moins dangereuse qu'une molécule très spécifique qui va finalement avoir des effets secondaires majorés.

## Application 3 : Le remodelage ionique et le syndrome de Brugada

Syndrome qui se traduite par une élévation du segment ST qui se voit très bien en VI et VII.



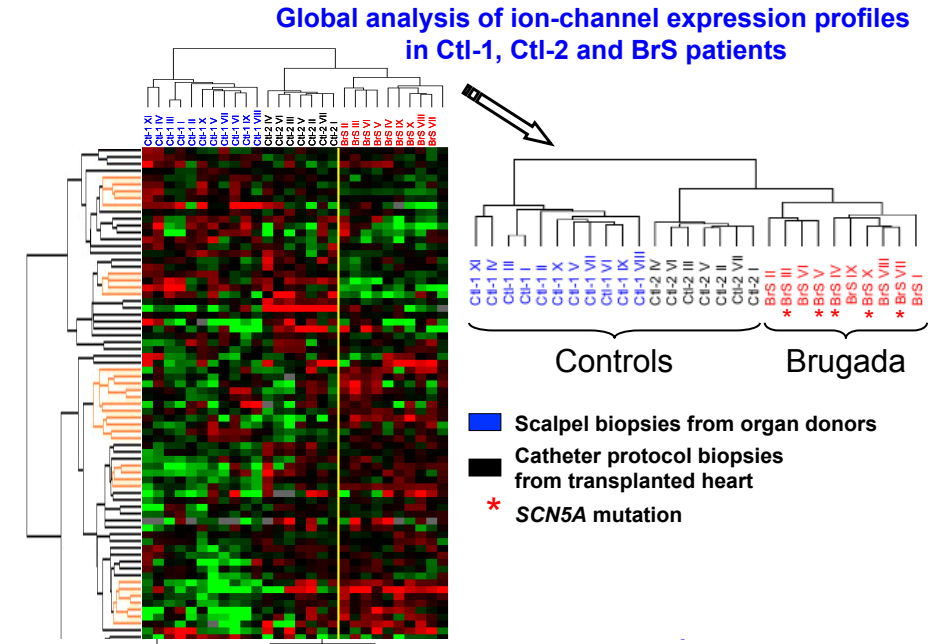

Ces patients ont également une mutation dans le gène qui code pour le canal sodique (on a essentiellement un seul type de canal sodique dans le cœur humain : Nav1.5).




Ci contre le regroupement des différentes mutations que peut présenter le canal.
Le canal sodique est une très grosse protéine qui est formée de 4 domaines de 6 segments transmembranaires. Ces 4 domaines s'organisent en

tétramère et c'est ce qui va former le pore.
Seulement on s'est rendu compte qu'il n'y avait que 20% des patients qui portaient une de ces mutations.
Hypothèse : il y a une modification de l'expression des canaux chez ces patient et finalement ce qu'ils partagent c'est plus une signature transcriptionnelle des canaux qu'une mutation ponctuelle sur un canal. Ce serait donc ca qui serait à l'origine des modifications de ces gènes qu'ils soient porteurs ou non d'une mutation.

**Méthodes** :
Collaboration avec un hôpital allemand car en France, nous n'avons pas le droit de faire une biopsie sur cœur car trop dangereux. On a ainsi obtenu les biopsies de 11 patients Brugada : 5 portant une mutation et 6 n'en portant pas.
Pour les contrôles on a utilisé des gens qui avaient reçu une greffe cardiaque (7) grâce à la biopsie pour suivi de greffe (pas vraiment des contrôles car ces patients suivent un traitement pharmacologique). On a également utilisé les cœurs donneurs (11) obtenus au scalpel (différent car au scalpel on récupère essentiellement de la surface : épicarde et pas trop en profondeur contrairement à la biopsie au cathéter).
On a également récupéré des biopsies de patients qui avaient d'autres cardiomyopathies qui ressemblaient à un syndrome de Brugada mais qui n'en n'étaient pas (arythmies du ventricule droit (10), pathologies d'éjection du ventricule droit (9)).
On a ensuite regardé le profile d'expression des canaux chez tous ces différents patients.
Voici les données d'expression que l'on a obtenu :




Le Logiciel a ensuite regroupé par homologie de profil et on voit que d'un coté tous les contrôles sont regroupés et de l'autre tous les patients atteints du syndrome de Brugada.
Cela signifie que les patients Brugada ont une expression des canaux suffisamment différente des autres pathologies pour les en séparer.
On peut également remarquer que les porteurs des autres pathologies se mélangent complètement avec les patients sains. Il est donc claire que c'est le profile d'expression des canaux plus que la mutation en elle-même qui caractérise le syndrome de Brugada.
On sait maintenant que le syndrome de Brugada n'est pas uniquement dû au seul canal sodique mais aussi à son taux d'expression.

## Application 4 : Signature transcriptionnelle des canaux associée à la fibrillation auriculaire

Arythmie la plus fréquente, sa prévalence augmente avec l'âge, due à des foyers ectopiques de naissance du foyer électrique qui conduit à une activation très rapide des oreillettes qui sont donc désynchronisées :



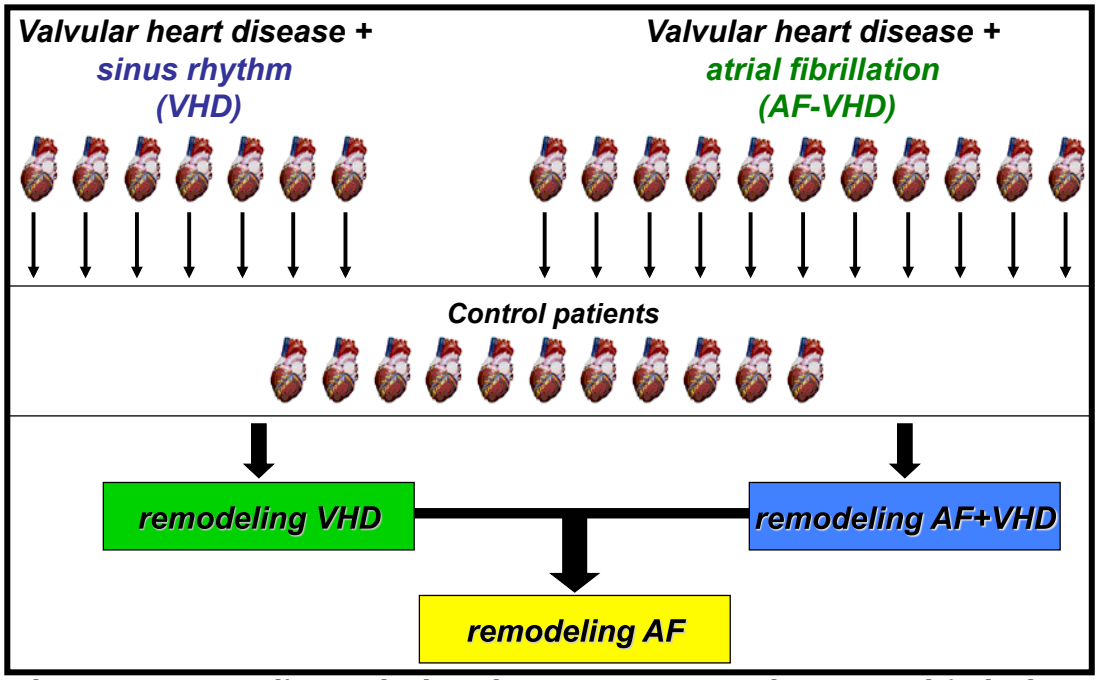
***Sinus rythm*** ***Atrial fibrillation***

On s'est intéressé à a fibrillation auriculaire car on sait que le remodelage électrique joue un rôle important dans cette pathologie. Montré notamment chez le chien chez lequel il est facile d'induire une fibrillation auriculaire car on peut lui implanter un pacemaker plus facilement qu'à une souris ce qui nous permettre de stimuler en permanence l'oreillette et ainsi de le faire passer en FA.

Avant cette approche de génomique on avait des modèles animaux en FA et on regardait de façon spécifique quelques gènes qui semblaient pouvoir être impliqués dans la FA. On savait par cette approche « gène à gène » que il y avait des modifications d'expressions de certains gènes. Ces études, souvent, s'intéressaient à des patients qui étaient en fibrillation auriculaire qui avait également une valvulopathie, elles ne permettaient pas vraiment de distinguer les causes des FA des causes des valvulopathies. On avait deux phénotypes corrélés donc c'était un peu délicat.

On a essayé de regarder l'ensemble des canaux qui étaient modifiés dans cette FA indépendamment de la pathologie primaire.

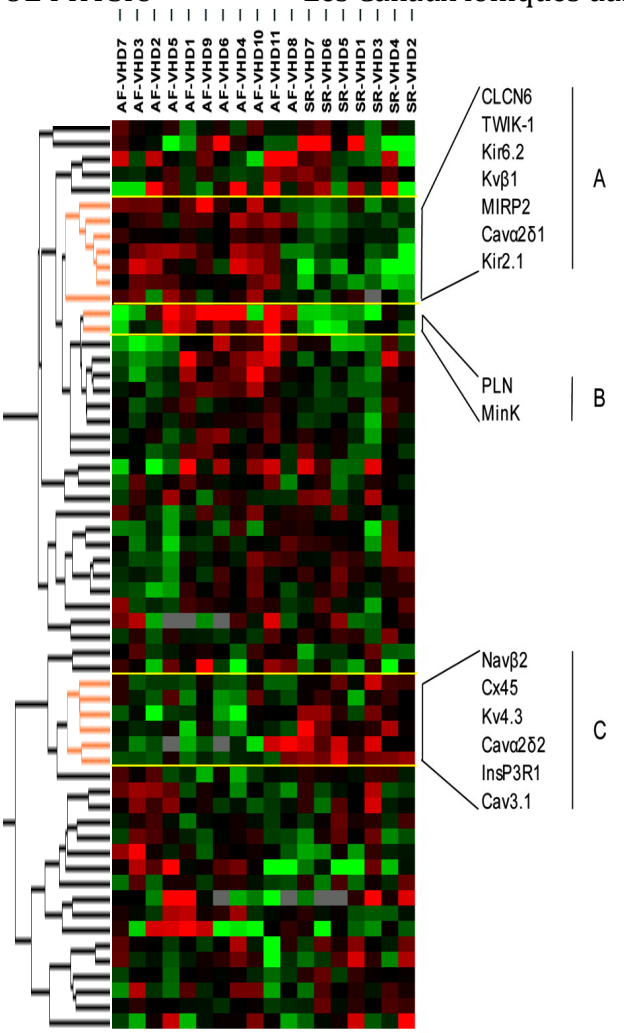
Donc voici l'étude qu'on a designé :

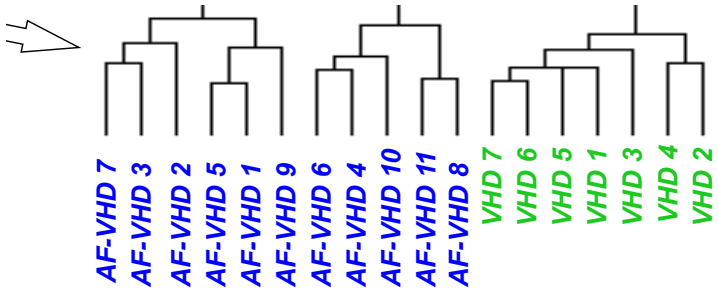



A gauche on a le groupe atteint d'une valvulopathie mais qui a un rythme sinusal (valvulopathie pure) ;
A droite on a le groupe atteint d'une valvulopathie et qui a une fibrillation atriale et en dessous un groupe contrôle.

En comparant les patients de gauche avec ceux de la deuxième ligne on obtient le remodelage qui est du a la valvulopathie, en comparant ceux de droite avec la deuxième ligne on obtient le remodelage du a la fibrillation atriale. Si ensuite on soustrait les deux on obtient le remodelage du a la FA.

Voici le clustering que l'on a obtenu :
On a ainsi pu distinguer les gènes qui étaient spécifiques de la FA et ceux qui ne l'étaient pas.




On voit des profils génomiques qui diffèrent en fonction des pathologies.

En A et B : on voit les gènes surexprimés chez les patients FA-VHD et sous exprimés chez les patients VHD
En C on voit les gènes sous exprimés chez les patients en FA et surexprimés chez les patients en VHD.
Ce doit donc être au niveau de ces gènes qu'est la spécificité des patients atteint de FA.

Si maintenant on regarde en détail les gènes qui bougent dans la FA : on voit déjà qu'il y a des gènes qu'on ne connaissait pas et d'autres qu'on connaissait (entourés) qu'on ne soupçonnait pas d'intervenir dans le mécanisme de la FA.

Ce qui est intéressant c'est qu'avec les nouveaux gènes découvert on a pu voir s'il y avait des mutations dans ces gènes et trouver des familles de patients à FA qui avaient des gènes qui codaient pour cette protéine là. Du coup ces nouveaux gènes découverts peuvent être utilisés comme cible pharmacologique.

| *Name* | *identifier* | *description* | *AF-specific variations* |
|---|---|---|---|
| *Cav3.1* | *NM_018896* | *calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit* | ↘ |
| *Cavα2δ1* | *NM_000722* | *calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1* | ↗ |
| *Cavα2δ2* | *NM_006030* | *calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2* | ↘ |
| *ITPR1* | *NM_002222* | *inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1* | ↘ |
| *PLN* | *NM_002667* | *phospholamban* | ↗ |
| *Navβ2* | *NM_004588* | *sodium channel, voltage-gated, type II, beta polypeptide* | ↘ |
| *CIC6* | *NM_021737* | *chloride channel 6* | ↗ |
| *Kvβ1* | *NM_003471* | *potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1* | ↗ |
| *MinK* | *NM_000219* | *potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1* | ↗ |
| *MIRP2* | *NM_005472* | *potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3* | ↗ |
| *Kv4.3* | *NM_004980* | *potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3* | ↘ |
| *TWIK1* | *NM_002245* | *potassium channel, subfamily K, member 1* | ↗ |

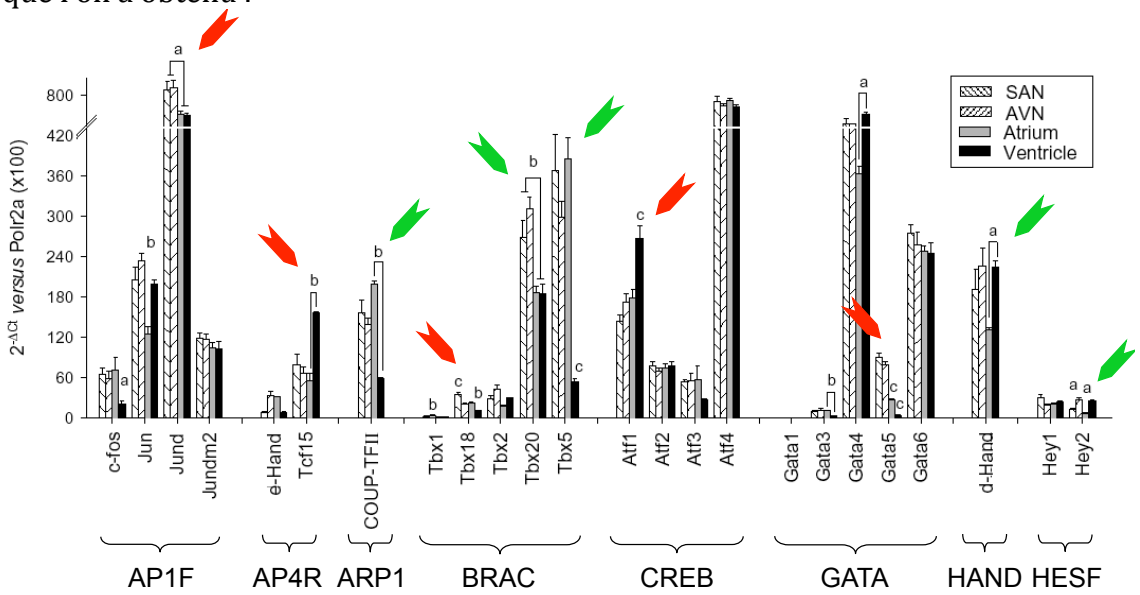
## Conclusions

La transcriptomic permet d'identifier l'expression spécifique de canaux ioniques dans différents syndromes arythmiques. Ca permet de découvrir de nouveaux mécanismes de pathologies, c'est aussi un bon outil pour découvrir de nouvelles cibles pharmacologiques. Et ca peut être également utilisé comme outil diagnostique (cancers).
Les nouvelles classifications sont désormais beaucoup plus fines qu'avant (classifications histologiques =S), ça permet vraiment de diagnostiquer la gravité du cancer comme les troubles du rythme.

Limites de ces approches: accessibilité du tissu cardiaque ; comment comprendre, intégrer et interpréter ces données ? Difficulté de valider la valeur fonctionnelle des résultats pour tous les canaux individuellement.

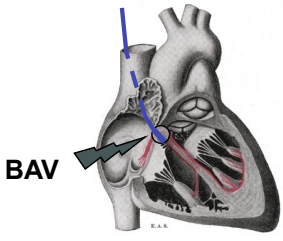
## IV. Specific ion channels profile : what are the transcription factors involved ?

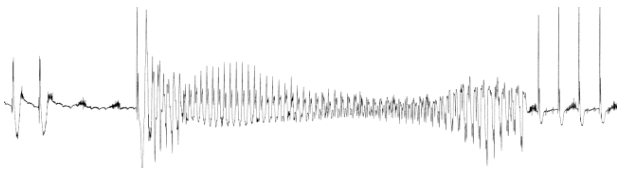
On s'est demandé si ces régulations des canaux étaient coordonnées et communes. C'est à dire est ce que l'expression des canaux qui sont codés par des gènes complètement différents est régulée de la même manière ? Ceci expliquerait les variations similaires de certains canaux dans certaines pathologies.
Pour répondre on a déterminé quels étaient les facteurs de transcription exprimés dans le cœur au stade embryonnaire et chez l'adulte :
On a récupéré du tissu de différentes régions du cœur de la souris et on a regardé l'expression des facteurs de transcription des canaux ioniques.
Et voilà ce que l'on a obtenu :




Chaque histogramme correspond à une région du cœur. C'est la représentation du niveau d'expression de chaque facteur d'expression dans les différentes régions du cœur.
Les flèches relèvent les modifications observées par rapport à un cœur sain.
Les flèches vertes pointent des facteurs de transcription connus, en rouges ceux qui n'étaient pas connus. On remarque que comme les canaux chaque facteur de transcription est régulé différemment selon la région.

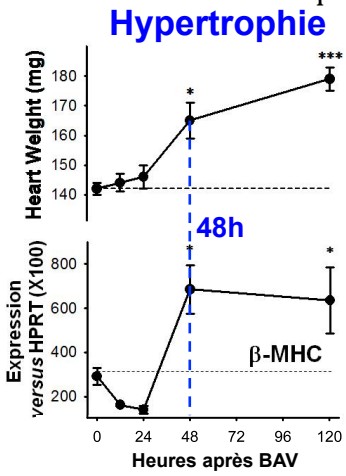
On sait très peu de choses sur la manière dont sont régulés les canaux. On s'est posé la question si les gènes qui ont la même régulation sont régulés par les mêmes facteurs de transcription (-_-') ? Dans ce cas là, ne partageraient-ils pas un profil d'expression commun ?
Du coup on a étudié un modèle d'hypertrophie
On a induit un bloc de conduction chez la souris en faisant une ablation du NAV. On obtient des troubles du rythme dès 12h qui ressemblent beaucoup aux torsades de pointes que l'on retrouve chez l'homme.
On a regardé quelle était l'expression des canaux ioniques chez ces souris :

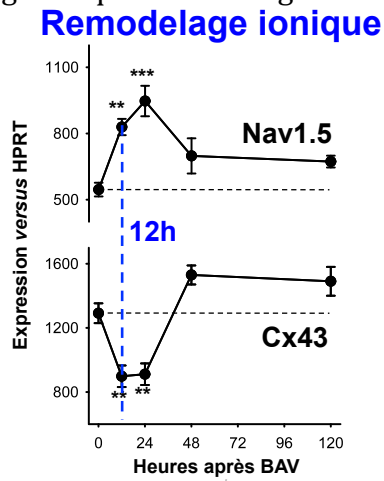


Dès 12h, il y a une modification ! En revanche les marqueurs de l'hypertrophie ne varient qu'à partir de 48h. Les troubles du rythme précèdent donc l'hypertrophie.
Dans ce modèle on a comparé en fonction du temps l'expression des canaux et des facteurs.

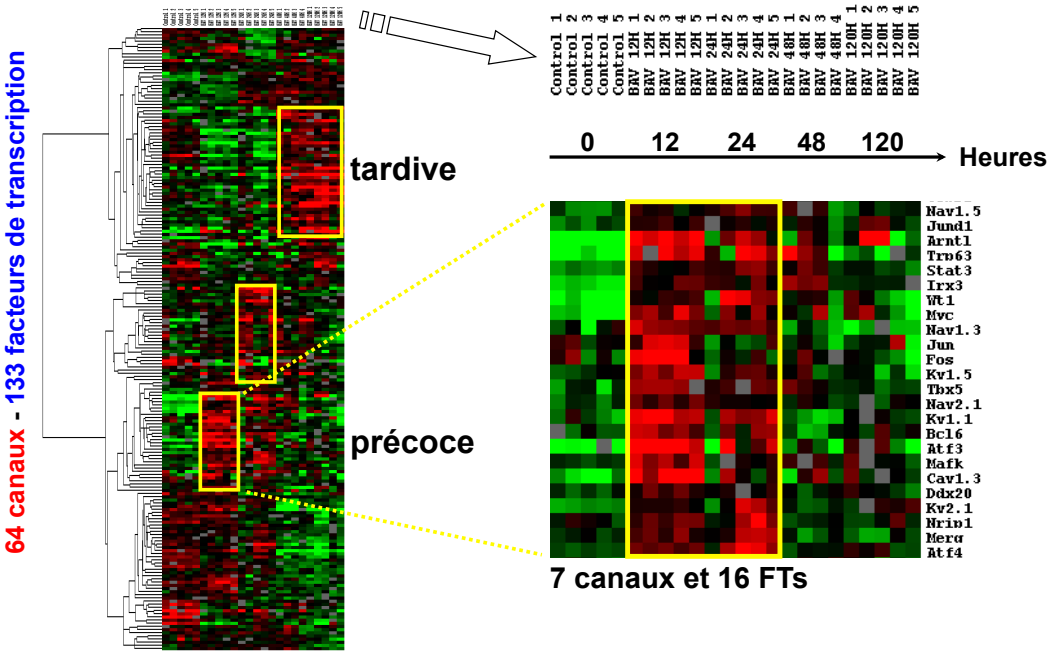
On a ici l'expression de 64 canaux et de 133 facteurs de transcription chez des souris contrôle et chez des souris en BAV en fonction du temps. On a imposé au logiciel d'organiser en fonction de la cinétique les différents échantillons mais il faut qu'il nous identifie les gènes qui ont une régulation commune.

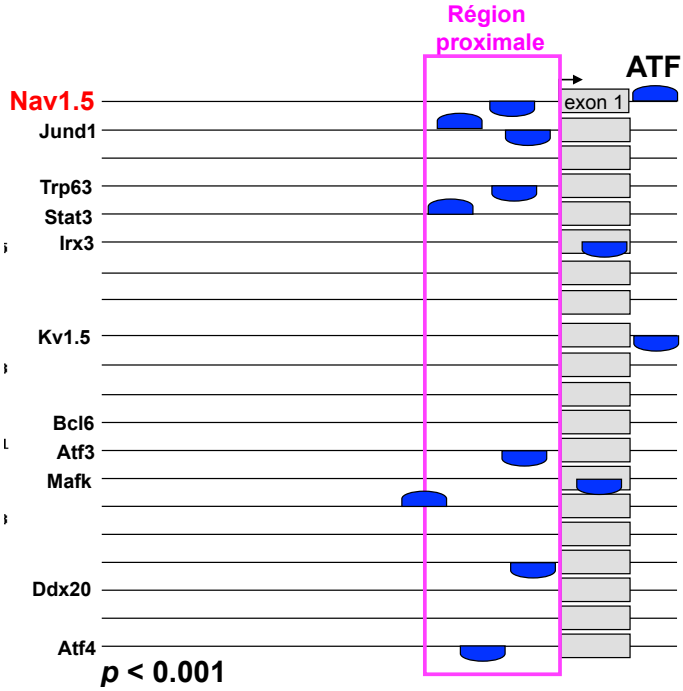



Comme vous pouvez le voir il y a des groupes de gènes qui sont surexprimés au fur et à mesure du temps. Comme les modifications dans les FA intervenaient des 12h on s'est intéressé

On a grâce à ce système identifié 7 canaux et 16 facteurs de transcriptions dont la régulation est exactement la même. Cela doit vouloir dire que dans ces facteurs de transcription il y en a surement qui contrôlent




l'expression des canaux. Pour valider ca, on va regarder l'ensemble des FTs qu'on a vu dans le cluster et on va regarder quels FTs vont travailler ensemble.

On a pu voir que parmi les 16 FT de la vague précoce il y en a 12 qui sont connus pour agir entre eux. Ils ont donc a priori ils ont une relation fonctionnelle.

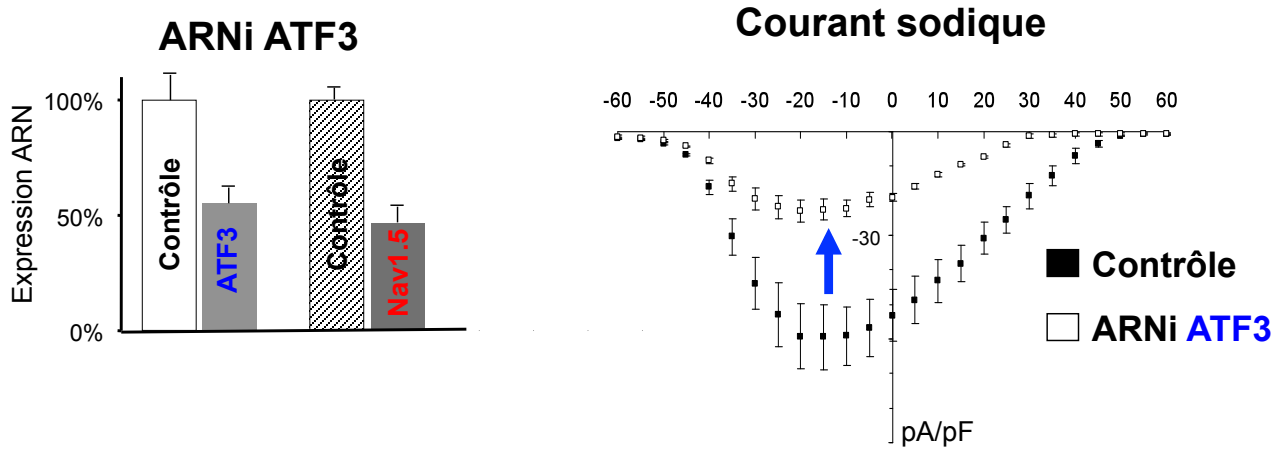
Ensuite on a fait de la prédiction bioinformatique

Si ces facteurs de transcription régulent les gènes, on devrait pouvoir retrouver leurs sites de fixation sur les zones promotrices des gènes des canaux. On a identifié les promoteurs et on a regardé si on reconnaissait les FT qui s'y fixaient. Résultat : ATF a des sites de fixations qui correspondent à pas mal de gènes du cluster. A priori il y a bien un rôle fonctionnel de ces FT qui bougent en même temps que les canaux.

ATF avait l'air d'être un bon candidat donc on a regardé ce qu'entrainait son inhibition sur le courant sodique

**Validation biologique et conséquences fonctionnelles**

On a pris des cellules cardiaques qu'on a mis en culture, on les a transfecté par un SiRNA contre ATF3, un petit ARN qui va bloquer l'ATF3.




En utilisant cela, on diminue l'expression d'ATF3 et on constate une diminution parallèle de Nav1.5 (gène du cluster qui est exprimé de façon précoce).

Dans les cellules qui n'ont plus d'ATF3 on a beaucoup moins de courant sodique. On met ainsi en évidence des mécanismes de régulation des canaux. Le but est ensuite de regarder si ces FTs ont un rôle dans l'excitabilité cellulaire.

Ce que l'on peut faire c'est analyser la fonction du promoteur bien plus en détail, on peut modifier les sites de fixation d'ATF sur le promoteur du canal sodique ou enfin évaluer les conséquences fonctionnelles in vivo de cette régulation.

*Je pense qu'on peut s'arrêter là hein… ! J'espère que ça vous a plu et donné envie de faire de la recherche =P*