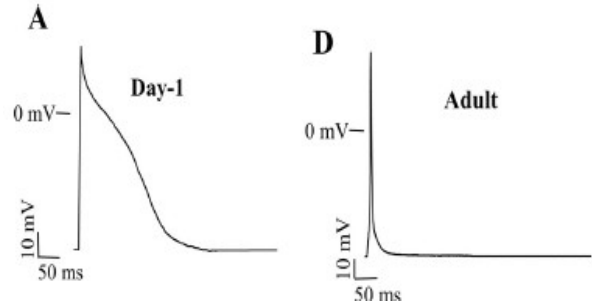


UE Physiologie et biologie des systèmes intégrés
Les canaux ioniques dans les arythmies cardiaques (DEMOLOMBE S.)
demolombe@ipmc.cnrs.fr

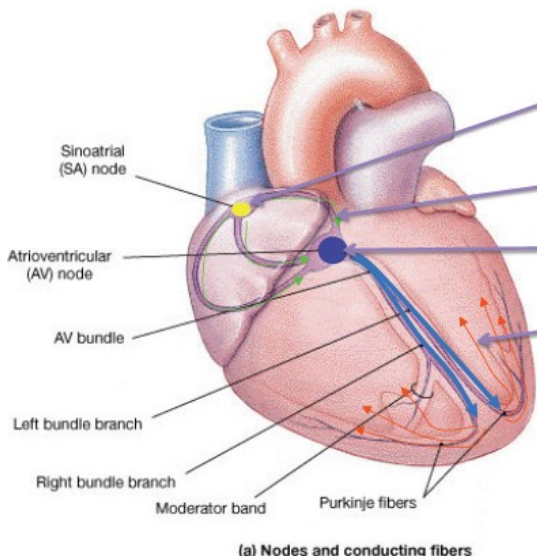
I/ ELECTROGENESE CARDIAQUE ET CONDUCTION DU SIGNAL

L'activité électrique cardiaque n'est pas figée, mais modulable. Elle hétérogène au sein du cœur, et évolue avec l'âge : on peut voir, chez la souris que la durée du potentiel d'action est importante au 1er jour de vie, puis est raccourcie chez l'adulte.

L'activité électrique évolue également en fonction des facteurs pathologiques, soit en raison de mutations de gènes codant pour des canaux ioniques, à l'instar du syndrome de Brugada soit par des médicaments.



Le but est de comprendre les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent l'électrogénèse cardiaque, au niveau physiologique et physiopathologique.



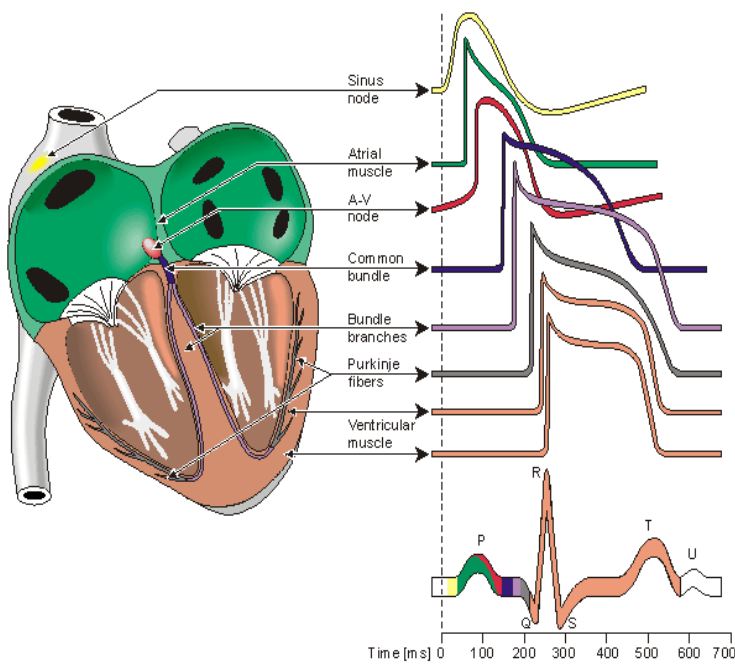
Le signal électrique naît dans le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite, le signal est conduit à travers les oreillettes, pour arriver dans le nœud auriculo-ventriculaire, qui va ralentir la vitesse de conduction, et une fois ce signal ralenti, il va se propager à travers les fibres de Purkinje pour atteindre les parois ventriculaires gauche et droite.

Lorsqu'il aura atteint les ventricules, le signal électrique va dépolariser l'endocarde, et diffuser à travers les parois afin de dépolariser l'épicarde, puis le tout va se repolariser en « sens inverse ».

Le signal électrique est caractérisé à l'échelle de l'organe par l'ECG, avec :

- l'onde P correspondant à la dépolarisation des oreillettes
- le complexe QRS correspondant à la dépolarisation ventriculaire
- et l'onde T caractérisant la repolarisation des ventricules.

La partie située entre onde P et onde QRS correspond au passage du signal dans le nœud auriculo-ventriculaire, où le signal est ralenti.



L'enregistrement à l'échelle de la cellule se fera sous la forme de potentiels d'action, comme on peut le voir sur le schéma, selon le lieu où l'on enregistre le PA, il n'a pas la même forme.

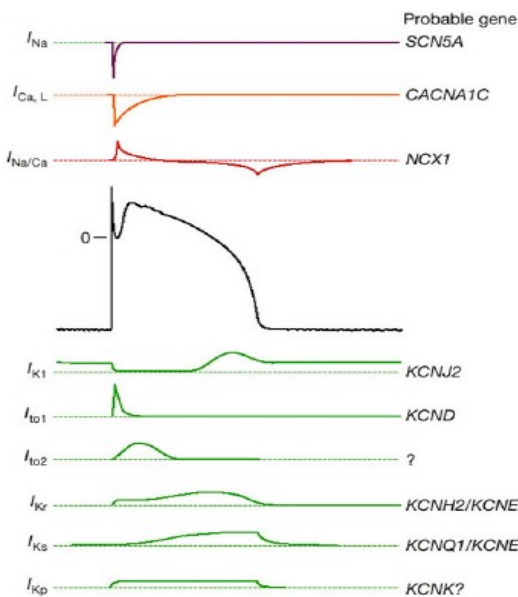
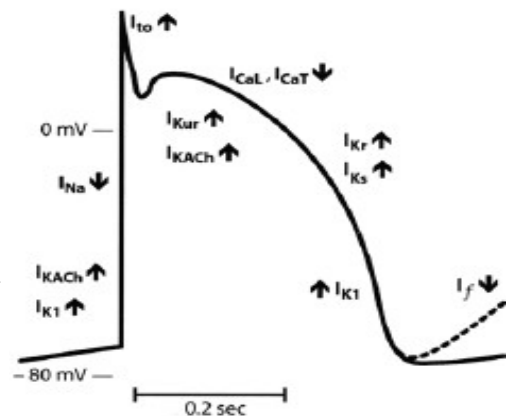
Dans le ventricule, le PA est beaucoup plus rectangulaire que dans le nœud sinusal, et il n'y a pas de pente de dépolarisation diastolique, responsable de l'automatisme du nœud.

Cela est valable pour chaque région du cœur, responsable d'une hétérogénéité et de l'aspect de l'ECG, qui est fondamentale pour le fonctionnement cardiaque. Si cette hétérogénéité est perturbée, il en résultera des troubles du rythme.

Comment est généré un potentiel d'action ?

Le PA résulte de l'activité de courants, il en faut plusieurs afin de générer un seul PA.

Comme on peut le voir sur le schéma, il existe plusieurs courants impliqués dans la formation du PA : il y a un courant sodique majoritairement responsable de la dépolarisation, qui est polarisée au repos à -80mV , puis pour générer un PA, elle va se dépolariser à $+20\text{mV}$, puis va se repolariser, grâce notamment aux courants potassiques, et va ensuite pouvoir être dépolarisable, afin de générer un autre PA.



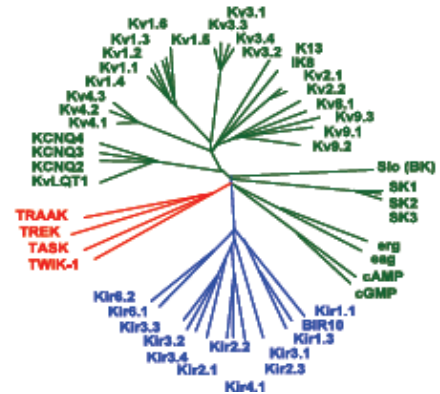
Sur cette diapositive ont été représentés différemment les courants impliqués, tout au long du PA, avec en haut l'activation des courants « entrants » et en bas l'activation des courants « sortants ».

Par exemple, le courant sodique va être activé tout de suite, entraînant une entrée de charges positives à l'intérieur de la cellule, et donc une dépolarisation puisqu'à l'état de repos, la membrane est polarisée positivement à l'intérieur, et négativement à l'extérieur. L'ensemble de ces courants seront responsables de la dépolarisation. A l'inverse, les courants potassiques sont fermés, puis lors de la modification des potentiels membranaires, il y aura ouverture de certains courants, majoritairement les courants potassiques, qui vont être responsables de la repolarisation, par sortie de charges positives.

Sur l'exemple ci-dessus, on a déjà 9 courants à l'origine de la formation de ce seul PA, or on voit qu'il existe plusieurs PA différents selon les cellules et les régions du cœur impliquées, et donc de multiples courants qui entrent en jeu.

Ces courants sont générés par des canaux ioniques (protéines membranaires traversant plusieurs fois la membrane pour former un pore) et chaque protéine formant ces canaux possède une sélectivité, c'est à dire, que les canaux ioniques ne laisseront passer qu'un seul ion, canaux sodiques, potassiques, calciques, chlores...

La génération d'un courant nécessitera l'activation de plusieurs canaux, de plus, les protéines transmembranaires des canaux ioniques sont associés à d'autres protéines régulatrices de l'activité du canal. Ainsi un canal ionique est un complexe formé de plusieurs protéines : la protéine principale α qui forme le pore, et la sous-unités β auxiliaires correspondant à l'activité régulatrice.

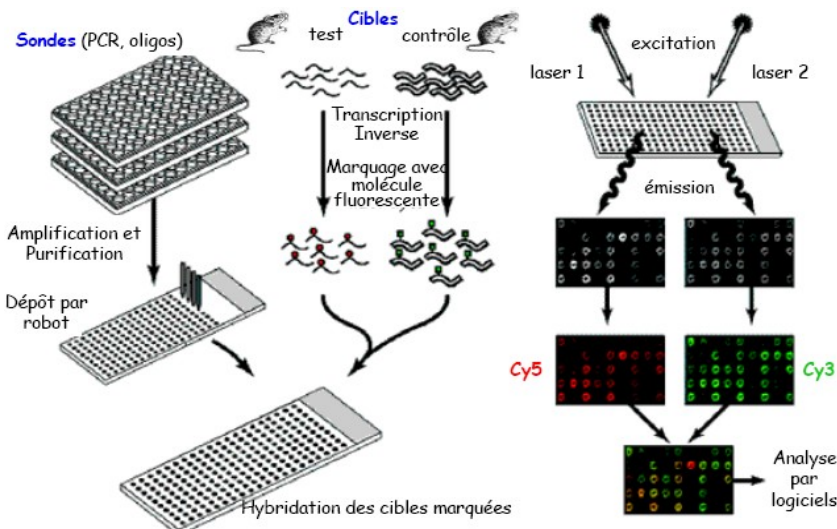


Cette diversité des acteurs rend compte de la complexité moléculaire de l'activité électrique cardiaque.

Si l'on descend jusqu'à l'échelle du génome, on connaît, rien que pour la famille des gènes potassiques, plus de 75 gènes codant pour ces canaux, de même pour les canaux calciques, chlore...

II/ OUTILS GENOMIQUES DEDIES AUX CANAUX IONIQUES

A/ Les puces à ADN



La base de l'étude des canaux ioniques dans les arythmies repose sur l'hypothèse que l'expression coordonnée des canaux ioniques gouverne l'hétérogénéité et le remodelage de l'activité électrique. C'est à dire que, tout cet ensemble de protéines est finement régulé, ce qui est responsable d'un bon fonctionnement cardiaque. Pour aborder l'expression des gènes à grande échelle, on peut s'aider de techniques de génomique, développée dans les années 1990.

Les puces génomiques sont fabriquées en déposant une séquence spécifique d'un gène sur une lame de verre. Chaque point correspondant à un gène différent, et on dépose sur cette lame de verre une séquence d'ADN spécifique du gène.

Si l'on prend, par exemple, le gène de l'acétylcholine, dont on connaît la séquence, et on va comparer sa séquence avec toutes celles du génome humain, et à partir de cette étape on obtient par comparaison, une séquence plus ou moins grande qui sera strictement spécifique du gène qu'on veut étudier, et on utilisera cette séquence spécifique pour fabriquer une sonde, soit sous forme :

- d'oligonucléotides (petite partie du gène qui comprend quelques bases spécifiques du gène) que l'on « spotte » sur les lames de verre, et on en fait de même pour chaque gène. Le plus long serait de « designer » la séquence spécifique, puis par synthèse chimique, on synthétise la séquence, et on le dépose sur la lame, pour obtenir un point spécifique de tel ou tel gène.
- de produits de PCR.

Ensuite, on choisira le matériel biologique que l'on veut hybrider, puis il faudra le marquer à l'aide de sondes fluorescentes.

On aura de l'ARN de sujets témoins (ou *controls*) et des souris traitées par un médicament, ou de patients. Les deux pools seront marqués avec des fluorophores différents lors de l'étape de rétro-transcription de l'ARN, pour un pool on utilisera du Cy5 (rouge) et pour l'autre du Cy3 (vert).

Une fois les deux pools marqués, et déposés sur les lames, il y aura compétition pour la fixation sur les spots. Donc pour le spot correspondant au récepteur à l'Acétylcholine, tous les transcrits (et donc ce qui est exprimé) vont reconnaître la séquence sur la lame et essayer de se fixer. Après le phénomène de compétition et de fixation, on va lire la lame, à l'aide de lasers de longueurs d'ondes spécifiques, on obtient ainsi deux images, l'une avec le Cy5 (Sujet 1) et l'autre avec le Cy3 (sujet 2), qui sont en noir et blanc, et que l'on colore artificiellement, et on superpose les 2 images.

- Si le spot est vert, cela signifie que pour le gène concerné, il y a plus de transcrits provenant du pool 2 que du pool 1. → le gène est plus exprimé chez les sujets du pool 1
- A l'inverse, si le spot est rouge, il y a plus de transcrit du pool 1 qui s'est hybridé.
- Enfin, si le spot est jaune, cela signifie que l'hybridation s'est faite de manière identique dans les deux pools.

Cela rend compte des variations d'expression des gènes entre les deux groupes (*control/test*).

Le travail supplémentaire, qui a été mis en œuvre dans ce domaine, a été de développer cet outil de génomique dédié à l'étude des canaux ioniques, où tous les gènes présents sur la puce, ne codent que pour les canaux ioniques.

Car ces derniers sont, de manière constitutionnelle, faiblement exprimés, donc si l'on « *spotte* » l'ensemble des gènes du génome, on risque de ne plus rien pouvoir lire, les canaux ioniques étant perdus dans le bruit de fond.

Ainsi, il a fallu développer des outils spécifiquement dédiés aux canaux ioniques. Pour cela, on a identifié quelles sont les séquences spécifiques des gènes codant pour les canaux ioniques, chez l'Homme et chez la souris, puis on les a « *designés* » et placés sur les lames de verre.

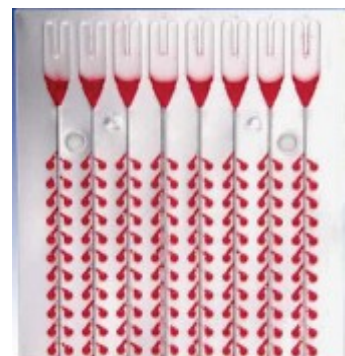
B/ La RT-PCR

La RT-PCR en temps réel à haut débit, repose sur une plaque avec chaque petit puits correspondant à un gène différent, donc avec une sonde comportant une séquence spécifique d'un gène.

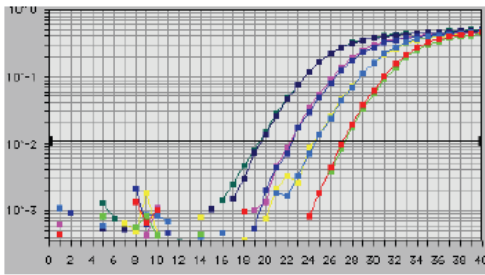
La différence avec la PCR classique repose sur la présence entre les deux *primers* d'une sonde fluorescente qui va s'hybrider, sur la sonde il y a un fluorophore et un *quencher*, tant que le *quencher* est proche du fluorophore, il va annuler la fluorescence, donc on ne peut rien mesurer, mais dès que le brin va être synthétiser, le *quencher* va être enlevé, le fluorophore sera libéré et émettra une fluorescence qui pourra être mesurée. Cette fluorescence sera mesurée à chaque cycle de PCR.

Dans chaque puits, il y a les *primers* spécifiques de chaque gène avec la sonde fluorescente, et on charge le réservoir avec du cDNA (de sujets témoins ou avec des patients), et par centrifugation, le matériel biologique va diffuser dans chaque puits, et on place le tout dans un thermocycleur, et tous les gènes seront lus en même temps, et on a également développé cette technique pour les canaux ioniques.

La plaque est vide, mais contient dans chaque puits *primers* et sondes fluorescentes, on charge avec du cDNA, on centrifuge, on met dans un appareil à PCR qui va mesurer la fluorescence en temps réel, et on obtient ce genre de courbes.



Les courbes sur le graphique représentent la fluorescence mesurée à chaque cycle. Pour les premiers cycles on ne mesure aucune fluorescence, il faut attendre le 16ème pour commencer à mesurer de la fluorescence, à chaque cycle il y aura une augmentation exponentielle de la fluorescence.



Data collection

On sait à quel gène correspond chaque courbe, pour atteindre un certain niveau de fluorescence il faut 18 cycles chez un sujet témoin (courbe bleu marine), et pour un sujet traité, il faut pour le même gène et le même niveau de fluorescence, il faut 26 cycles (courbe rouge), cela veut dire qu'il est moins exprimé. La RT-PCR est plus pratique que la technique précédente, car elle est semi-automatique, il suffit de commander les plaques avec les gènes d'intérêt, et est « *pré-spottée* », et se fait rapidement.

C/ Analyse des données de génomique et classification hiérarchique

Une fois que l'on a toutes ces données de génomique : on sait que tel ou tel gène est fortement ou faiblement exprimé, dans les différentes conditions, on peut les représenter ainsi.

Cette classification à partir des techniques de génomique est surtout utilisée dans les classification des pathologies, notamment dans le cancer (dont on revoit la classification, qui reposait surtout sur l'aspect histologique, alors que maintenant on essaye de classer selon le profil d'expression des gènes).

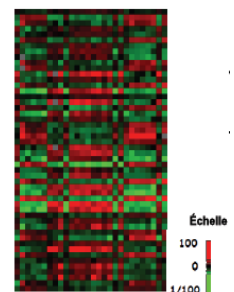
On inscrit l'ensemble des données de génomique que l'on obtient, pour chaque échantillon (dans les colonnes) et pour chaque gène (dans les lignes), chaque point (croisement entre une ligne et une colonne) représentant une valeur d'expression numérique (ex : 40, 50...) pour un gène particulier dans un échantillon particulier.



Quantification

Si l'on fait une coloration artificielle de ces données numériques, le logiciel va colorer les gènes très exprimés en rouge, et les gènes moins exprimés en vert. On rappelle que chaque colonne représente un échantillon et donc l'expression des différents gènes dans 1 échantillon, et sur une même ligne on a l'expression d'un même gène dans tous les échantillons.

Le logiciel va sur une même ligne colorer et classer chaque point, donc dans chaque échantillon, selon l'expression du gène. Puis il va faire la même chose mais sur une même colonne, pour classer les gènes dans un échantillon. → Classification à deux voies.



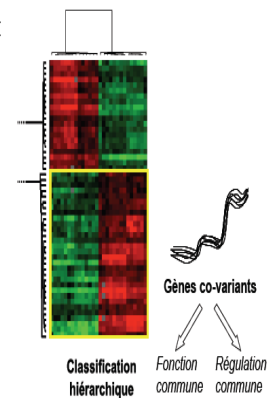
Colorisation
Rouge = sur-exprimé
Vert = sous-exprimé

Le logiciel va ainsi classer dans les deux sens, vertical et horizontal, et cela donne cet aspect.

Ensuite, le logiciel va classer l'ensemble de ces données, et les organiser ainsi :

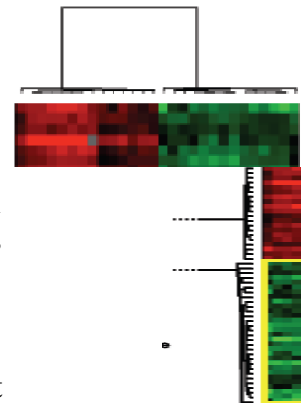
- tous les gènes ayant un profil comparable dans les différents échantillons sont regroupés ensemble
- ensuite, les échantillons, qui ont pour l'ensemble des gènes le même profil d'expression seront regroupés ensemble.

Ainsi, le logiciel classe par similarité, par exemple, les gènes dans le carré jaune ont, quelque soit les échantillons, un profil d'expression comparable : sous-exprimés dans le premier groupe d'échantillon et sur-exprimés dans l'autre groupe. Et inversement pour les gènes au-dessus du carré jaune. Si l'on lit dans l'autre sens, les premières colonnes montrent tous les échantillons qui, quelque soit les gènes ont le même profil d'expression, et les autres colonnes représentent les échantillons ayant un profil d'expression inverse.



Le regroupement des gènes et des échantillons se fait à l'aide d'un dendrogramme, avec pour chaque petite barre à un échantillon ou à un gène, et plus la distance entre deux branches est courte, plus la similarité est importante.

Ici le dendrogramme est tout tassé, on distingue à peine les différentes branches, car la similarité entre les différents échantillons est très grande. En revanche, la distance entre les deux groupes d'échantillons est beaucoup plus grande, car ils ont des profils d'expression très différents.



De même pour les gènes, lorsqu'ils sont exprimés de manière comparable quelque soit l'échantillon, la distance est très faible, mais pour les gènes dont la similarité est très faible, la branche est beaucoup plus longue.

Cette technique est particulièrement intéressante si l'on travaille à l'aveugle, si, par exemple, on reçoit beaucoup d'échantillons et si l'on ne sait pas si ils sont dans le groupe des traités ou des placebo, en faisant le profil d'expression des patients, on obtient deux groupes distincts d'échantillons et donc de sujets, traités ou témoins. De plus, les gènes présentant un même profil d'expression partagent la même fonction, ou sont régulés au niveau de la transcription de manière identique.

Par ex, si l'on s'intéresse à des gènes du métabolisme chez des diabétiques, leur expression sera altérée, ils seront sous-exprimés. A l'inverse, les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire seront tous sur-exprimés car partageant une même fonction.

D/ Corrélation entre données de génomique et phénotype

Toutes ces données de génomiques sont très utiles, mais sont insuffisantes pour évaluer la fonctionnalité des protéines, lorsque l'on travaille sur les canaux ioniques, il est possible d'en mesurer l'activité par des techniques de patch-clamp (qui consistent à poser une pipette sur une cellule, et on mesure les mouvements ioniques de part et d'autre de la cellule, et donc l'activité d'un courant.

Pour s'assurer de la mesure d'un courant en particulier, on peut utiliser des bloqueurs pharmacologiques ou des conditions particulières entre milieu extra-cellulaire et le milieu intra-pipette. On peut représenter l'activité des canaux ioniques sous forme de PA ou d'ECG si l'on s'intéresse à l'organe entier.

L'idée est de vérifier si les profils d'expression que l'on a évalué, ont une conséquence fonctionnelle, il est important de corréler les données transcriptionnelles avec les données fonctionnelles, si l'on veut corréler les données moléculaires avec le phénotype.

L'activité électrique est hétérogène au sein du cœur, on s'est demandé si cette activité hétérogène correspondait à un profil d'expression hétérogène, ce qui devrait être le cas, mais cela n'avait jamais été démontré, personne n'avait mis en évidence le répertoire exhaustif de l'expression des canaux ioniques dans les sinus, les oreillettes, alors que ce sont des données fondamentales.

III/ APPLICATIONS :

A/ Hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur et génomique des canaux ioniques

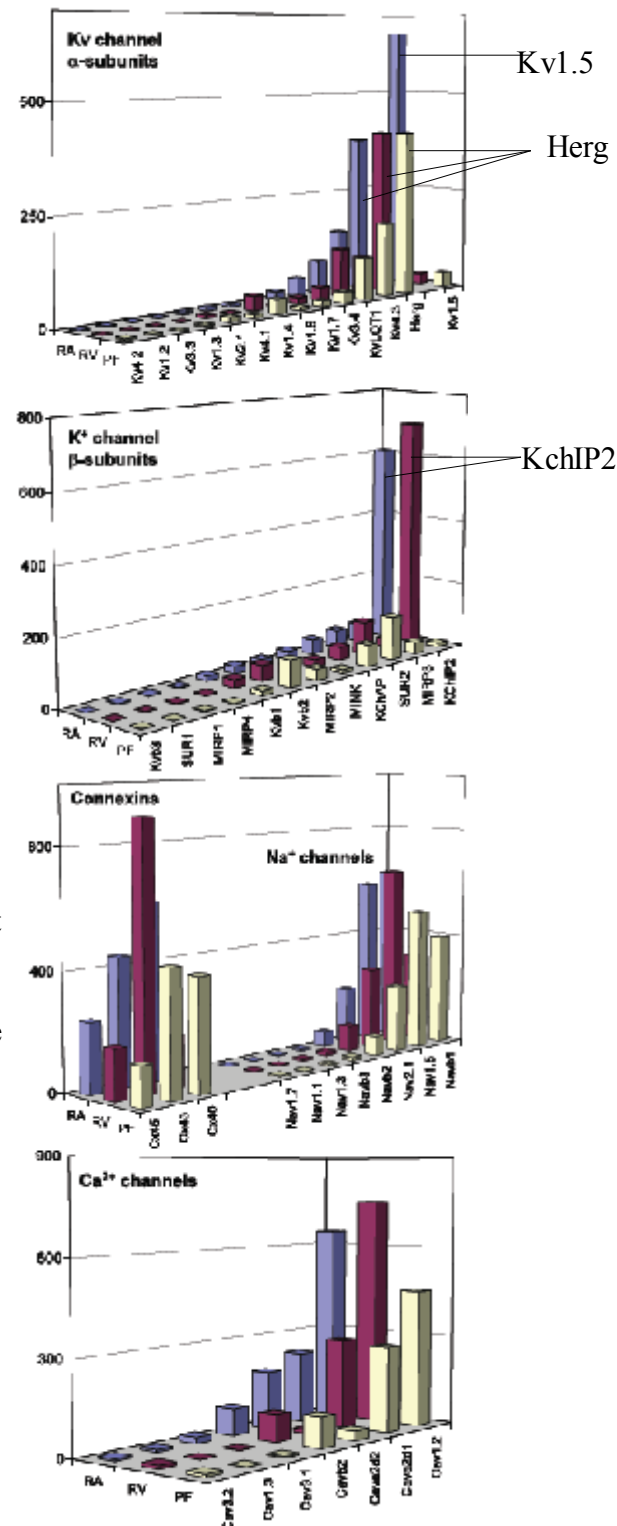
Cette base moléculaire étant manquante, il a été décidé de mettre en place un annuaire des canaux exprimés dans chaque compartiment, chez la souris et chez l'Homme.

Chez l'Homme on récupère du tissu cardiaque sain sur les cœurs qui devaient être greffés et qui n'ont pas pu l'être au dernier moment (transport trop long, complications de dernière minute chez le receveur...), on a ainsi quelques cœurs, il a été possible d'en récupérer plus en Hongrie (où l'on ne fait pas de transplantation cardiaque, mais seulement la greffe de valves, le reste du cœur pouvant être utilisé à des fins de recherche). Mais, comme il n'a pas été possible de récupérer, chez l'Homme, autant de tissu que chez la souris, deux études ont été ainsi menées en parallèle, notamment parce que les nœuds sinusaux et auriculo-ventriculaires n'ont pas pu être étudiés chez l'Homme. Chez l'Homme, on a pu comparer les profils d'expression dans les oreillettes droites et gauches, pour voir quels sont les courants responsable de l'asymétrie droite/gauche.

A titre d'exemple (*l'idée n'est pas d'apprendre le répertoire exhaustif de tous les canaux dans tous les compartiments*), voilà le profil d'expression des canaux chez l'Homme, qui est représenté sous forme d'histogramme, regroupés en famille, la famille des canaux potassiques (sous-unités α et β), les connexines et les canaux chlore. Et on exprime les résultats en bleu pour l'oreillette droite, en violet pour le ventricule droit, et en jaune dans les fibres de Purkinje.

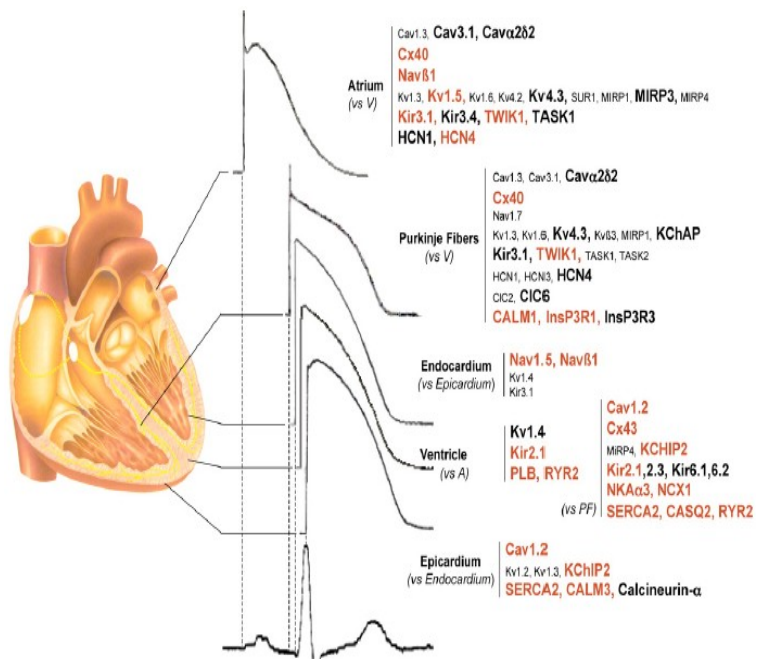
Tout cela est représenté par niveau d'expression, par exemple, pour le canal Kv1.5 est plus exprimé dans l'oreillette droite que dans les deux autres zones, en regardant ces histogrammes, qu'il y a des canaux peu exprimés quelque soit le compartiment, et à l'inverse dans une même famille de canaux il y a des gènes qui sont très exprimés.

Et l'expression de ces canaux est corrélée avec leur importance fonctionnelle, par exemple le canal Kv1.5 est très intéressant d'un point de vue pharmacologique, car il est spécifique de l'oreillette. Donc si l'on développe un bloqueur de ce canal, il ne devrait agir que sur l'oreillette. Il y a des canaux qui sont très exprimés quelque soit le compartiment, comme le canal Herg, qui est fondamental dans la repolarisation cardiaque, et qui est gênant d'un point de vue pharmacologique, car il interagit avec beaucoup de médicaments, notamment les antihistaminiques, les antidépresseurs, avec comme risque principal, la survenue d'arythmies. Ainsi lors des procédures d'AMM, on teste l'affinité de la molécule avec ce canal, car il y a eu plusieurs incidents.



Ainsi, on a pu déterminer quels gènes entrent en jeu dans l'hétérogénéité de l'activité cardiaque, Kv1.5 dans l'oreillette doit avoir un rôle dans la spécificité du PA auriculaire, et la sous unité régulatrice KchIP2 va avoir un rôle important dans les oreillettes et ventricules mais pas dans les fibres de Purkinje... On a pu ainsi obtenir un profil complet de l'expression des canaux ioniques, chez l'Homme, en fonction des différentes régions, voilà l'ensemble des gènes exprimés, avec en rouge les gènes fortement exprimés, en gras, les gènes moyennement exprimés et en petits caractères, les gènes faiblement exprimés.

Chaque région a un profil d'expression spécifique des canaux ioniques, ce qui explique l'hétérogénéité de l'activité électrique cardiaque.



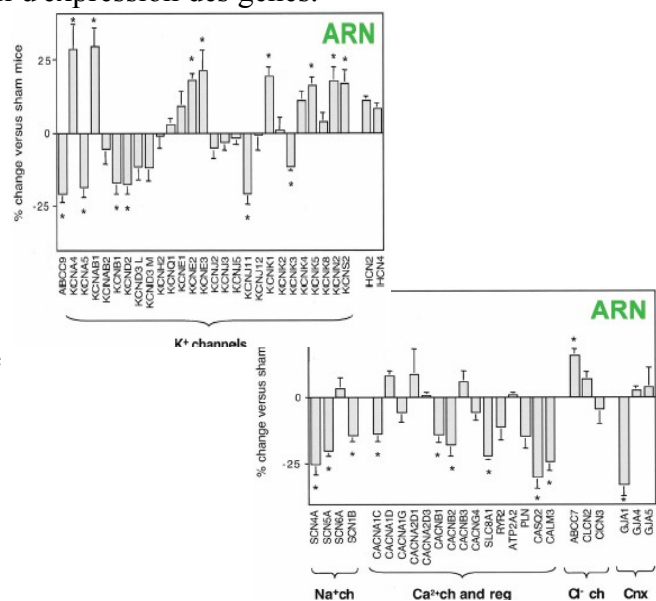
B/ L'anti-arythmique amiodarone et la génomique des canaux ioniques

L'amiodarone (*anti-arythmique le plus efficace à l'heure actuelle*) bloque l'activité des canaux potassiques, mais possède également un atome d'iode, qui lui permet de se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes, qui sont des facteurs de transcription.

Le profil d'action de l'amiodarone est très complexe, car, non seulement, il agit directement sur les canaux potassiques (anti-arythmique de classe 1), mais également les canaux sodiques et calciques (anti-arythmique de classe 2 et 3 également), et on a remarqué qu'il y avait également une modification de l'activité thyroïdienne.

On s'est rendu compte que, l'activité de l'amiodarone ne pouvait se limiter à un simple blocage des canaux K⁺ (comme cela avait été présenté au départ), on s'est demandé si l'amiodarone, qui doit allonger la durée du PA, ne modifiait pas le profil d'expression des gènes.

Pour étudier cela, on a traité des souris avec des doses croissantes d'amiodarone, (30, 90, 180 mg/kg/jour) correspondant aux doses thérapeutiques chez l'Homme, pendant 5 semaines. En étudiant le profil d'expression des gènes à l'aides des puces à ADN, et en l'expriment en % de variation avec les souris *control*, on voit qu'il y a un nombre considérable de gènes dont l'expression est modifiée par le traitement, ainsi lorsque l'on traite de manière chronique, on voit qu'il y a un grand nombre de gènes dont l'expression est modifiée.

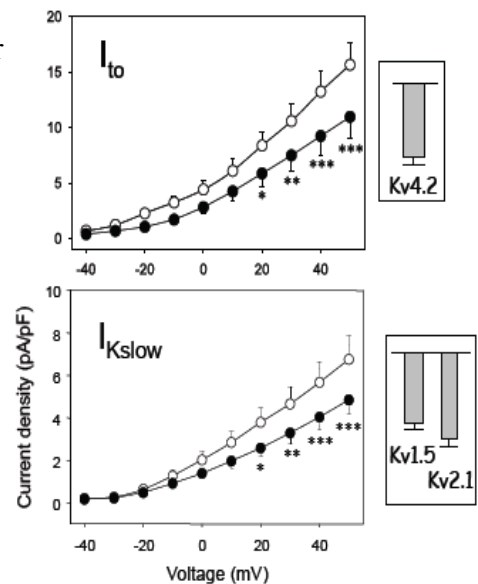


Il est indispensable de vérifier si ces modifications de l'expression génique ont des conséquences fonctionnelles pour affirmer le fait qu'une partie de son action thérapeutique passe par la modification de l'expression des canaux ioniques. Pour cela, on isole des cardiomyocytes provenant de souris *control* et traitées.

Si l'on prend, par exemple la canal Kv4.2, qui est sous-exprimé après traitement, et responsable du courant I_{to} , chez les souris, on voit qu'il y a une diminution du courant I_{to} , attestant la corrélation entre les données moléculaires et la fonction.

De même, les canaux Kv1.5 et Kv2.1 génèrent le courant I_{Kslow} , les deux canaux seront sous-exprimés chez les souris traitées, et l'activité du courant sera réduite.

Il n'a pas été possible d'effectuer une validation exhaustive pour les canaux, mais pour quelques canaux, on a pu démontrer qu'il y a des conséquences fonctionnelles.



Cela se traduit également à l'échelle de l'organe, puisque chez la souris l'ECG (qui est fondamentalement de l'ECG humain, la fréquence cardiaque étant de 600 Batt/min, rendant difficile la lecture de la repolarisation des ventricules, l'onde T étant noyé dans le QRS) est modifié chez les souris traitées, avec une fréquence cardiaque diminuée, une onde QRS élargie, une repolarisation plus importante, correspondant à l'effet thérapeutique voulu.



On a pu au travers de cette étude, conclure pour la première fois que les anti-arythmiques pouvaient agir en modifiant l'expression des gènes, et en l'occurrence des canaux ioniques, ce qui est intéressant pour le développement de nouveaux anti-arythmiques.

L'amiodarone est l'anti-arythmique le plus utilisé, or, il va complètement à l'encontre des grands principes de la pharmacologie, qui avancent que l'on recherche surtout des médicaments très spécifiques.

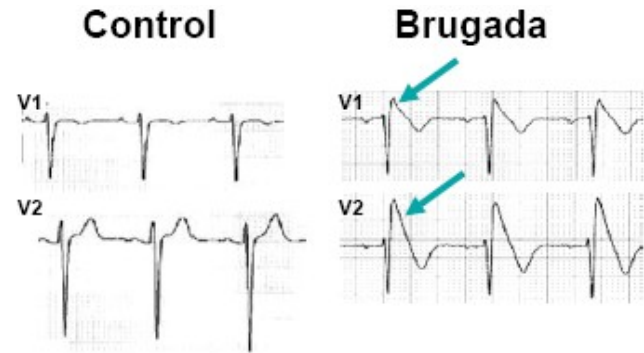
Alors que l'amiodarone agit différemment, en effet, il a plusieurs cibles, et agit à la fois directement, mais également au niveau de l'expression, et c'est cela qui fait qu'il marche très bien, et mieux que tous les autres.

Rendant ainsi compte de l'idée qu'il faut arrêter de penser qu'un bon médicament doit être forcément spécifique d'une cible, au contraire, si l'on se place dans une vision plus globale, ne serait-ce qu'à l'échelle d'une cellule, que si l'on bloque une cible, la cellule va répondre et compenser, et plus on est spécifique et plus la réponse va être importante, et donc plus les effets secondaires seront importants.

A l'inverse, plus la molécule agit globalement, moins il y aura d'effets indésirables, et l'effet thérapeutique sera plus efficace, car une fonction n'est pas portée par un gène mais par plusieurs. Si l'on veut allonger le PA, il ne faudra pas agir sur un seul gène, mais sur plusieurs qui ont un rôle dans la repolarisation.

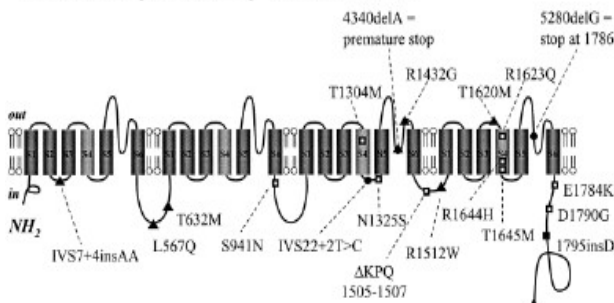
C/ Le remodelage ionique et le syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada est une arythmie caractérisée par une élévation du segment ST, dont on ne connaissait pas l'étiologie et qui conduisait à des troubles du rythme voire la mort subite de l'adulte, notamment à l'effort, et qu'on peut retrouver chez plusieurs membres d'une même famille.



Ce syndrome est souvent dû à des mutations sur les gènes codant pour les canaux ioniques, on en connaît une vingtaine susceptible de donner des morts subites, par transmission familiale.

SCN5A (Nav1.5) mutations



On ne savait pas à quoi ce syndrome était dû jusqu'aux années 1990, où l'on découvrit que les patients atteints étaient porteurs d'une mutation dans un gène codant pour le canal sodique Nav1.5, principal canal sodique du cœur, et est responsable de la dépolarisation. Lorsque sa fonction est altérée, il n'y a pas d'autres canaux pour compenser sa dysfonction, ce qui a des conséquences fonctionnelles importantes.

Tous les points sur la protéine représentent l'ensemble des mutations identifiées sur ce canal.

Ce canal est l'un des plus gros, il est composé de 4 domaines répétés de 6 segments transmembranaires, ces 4 domaines se replient dans la membrane pour former un pore. Ces mutations conduisent à une perte de fonction du canal sodique (contrairement au syndrome du QT long où il y a un allongement du PA avec gain de fonction).

Mais avec le temps, on s'est rendu compte que seuls 20% des patients atteints du syndrome de Brugada avec sus-décalage ST à l'ECG, ont une mutation au niveau de ce canal. Donc, on s'est dit qu'il y avait une altération de l'expression du gène codant pour ce canal, et pas seulement une mutation au niveau du gène.

On a biopsié des cœurs de 11 patients atteints du syndrome de Brugada, dont 5 porteurs d'une mutation du gène SCN5A et 6 non-porteurs, on a choisi pour les tissus *control*.

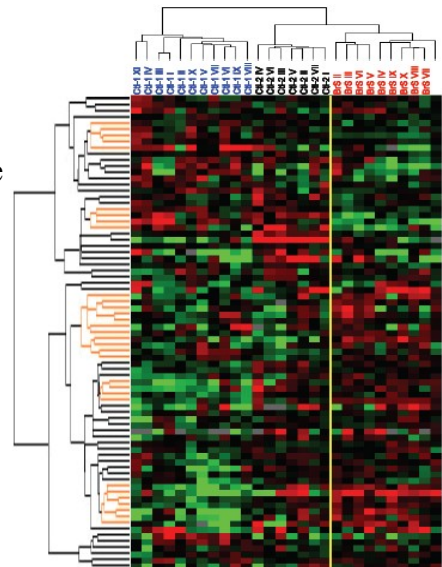
Des biopsies ont été réalisées dans le cadre de suivis de greffe (*mais compte tenu de la pharmacologie lourde à laquelle sont soumis ces patients on peut difficilement les considérer comme témoins*), mais également provenant de cœurs qui devaient être greffés (*cf avant, même si le tissu est sain, le prélèvement n'est pas effectué de la même manière, puisqu'il s'agit de coupes à l'aide de scalpel, ce qui peut être à l'origine de variations et donc de biais*).

Enfin, on veut voir si l'on obtient des profils d'expression génique spécifique pour le syndrome de Brugada par rapport à d'autres pathologies caractérisées par une arythmie du ventricule droit : biopsies de patients atteints de cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (ARVC), et de tachycardie ventriculaire idiopathique de la voie d'éjection (RVOT).

On a extrait l'ARN des biopsies, synthétiser le cDNA et on a testé le profil d'expression pour l'ensemble des canaux ioniques.

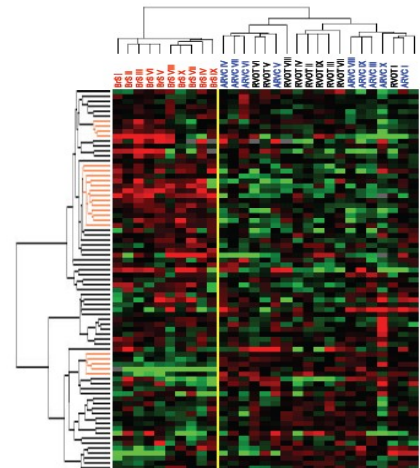
On a regardé comment l'ordinateur a classé les échantillons, il a regroupé les patients *control* et les patients Brugada, cela veut dire qu'il y a suffisamment de canaux ioniques différemment exprimés pour faire la distinction entre les deux groupes, si il n'y en avait qu'un ou deux, les *control* et les Brugada auraient été mélangés.

Les patients porteurs d'une mutation sur le gène SCN5A (marqués avec une astérisque) sont mélangés avec les autres, donc globalement, cela ne semble pas faire de différence, le plus important pour le Syndrome de Brugada est donc la modification de l'expression des gènes qui en résulte



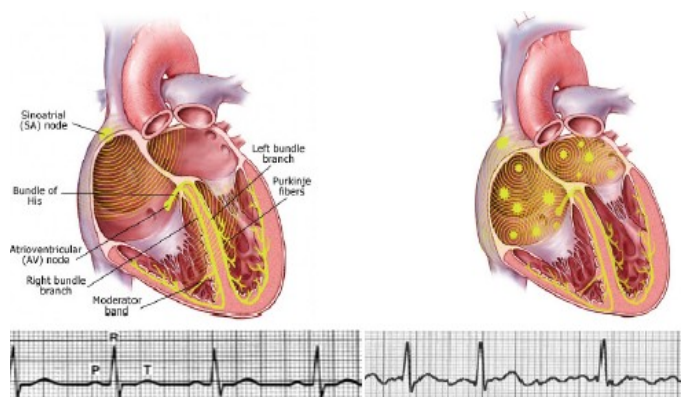
On a ensuite comparé ces patients Brugada avec les autres patients présentant une tachycardie ventriculaire (ARVC + ROVT), et on peut voir que les patients Brugada ont un profil qui se distingue de ces autres patients.

Les canaux impliqués dans cette différence de profil d'expression génique, entre *control*+ARVC+ROVT et Brugada sont au nombre de 15, et permettent de comprendre le mécanisme conduisant à ce syndrome et de développer des anti-arythmiques contre ce syndrome.



D/ Profil d'expression des canaux ioniques associés à la fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque la plus fréquente (+ de 2 millions de personnes aux USA), la probabilité d'apparition augmente avec l'âge. Elle consiste en une désynchronisation du rythme cardiaque par genèse de foyers ectopiques de signal électrique qui fait qu'il y aura une activité irrégulière des oreillettes. Le signal électrique naît dans le nœud sinusal, et ce dernier va imposer son rythme car il est plus rapide, mais l'apparition de nombreux foyers dans l'oreillette plus rapides qui vont envoyer un signal électrique au nœud auriculo-ventriculaire, ce qui va désynchroniser l'activité du cœur.



La contraction des oreillettes ne va pas être efficace, ce qui provoquera une dilatation des oreillettes, puis une fibrose. Il a été prouvé que les foyers ectopiques naissent au niveau de l'abouchement des veines pulmonaires sur l'oreillette, et l'un des traitements repose sur l'ablation de ces foyers ce qui permet de traiter efficacement la FA.

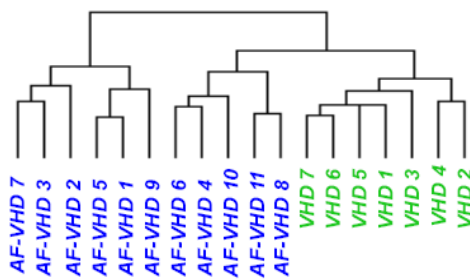
Avant de connaître les mécanismes de la FA, on savait que la remodelage électrique, c'est à dire l'expression des canaux ioniques, joue un rôle important dans l'apparition de la maladie. Cependant, lorsque les techniques de génomique n'étaient pas encore disponibles, on étudiaient seulement quelques canaux ioniques.

Parmi les facteurs de risque les plus importants de la FA sont les valvulopathies, et l'un des problèmes des études qui avaient été menées jusqu'alors était qu'elles s'intéressait à des modèles de FA avec valvulopathies. Donc, à partir des résultats obtenus, on ne savait pas, ce qui était du à la FA et aux valvulopathies, puisque tous les cas étudiés présentaient une valvulopathie primitive. On a voulu déterminer de manière exhaustive quels sont les remodelages impliqués dans la FA, indépendamment des valvulopathies.

Pour cela, on a récupéré des oreillettes de patients présentant une valvulopathie mais en rythme sinusal, mais également de patients présentant une valvulopathie avec FA, et enfin des patients *control* (les oreillettes saines sont relativement faciles à obtenir puisqu'elles font partie des déchets opératoires lorsque l'on met un patient sous circulation artificielle).

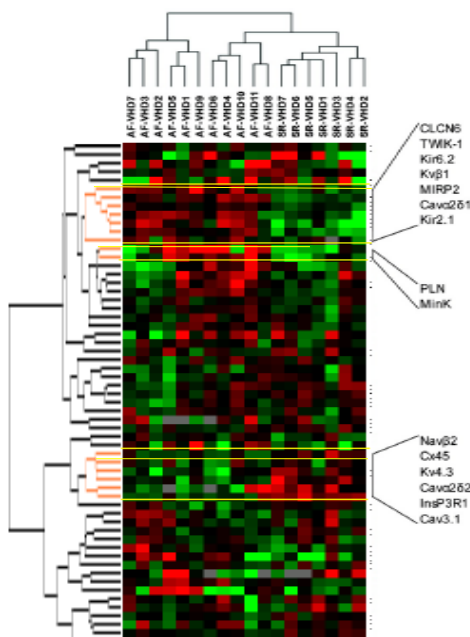
On a comparé les patients présentant une valvulopathie sans FA avec les patients *control* pour obtenir le remodelage associé avec la valvulopathie.

On a également comparé les patients présentant une valvulopathie avec FA avec les patients *control*, et on obtient le remodelage impliqué dans la FA+valvulopathie.



Enfin on soustrait les 2 remodelages pour obtenir le remodelage spécifique de la FA, et on obtient une classification hiérarchique à 2 voies.

Lorsque l'on étudie l'expression des canaux ioniques, on remarque que le logiciel va distinguer les échantillons provenant de patients atteints de FA+valvulopathie (AF+VHD) de ceux de patients atteints de valvulopathie uniquement (VHD).



Les gènes impliqués dans cette distinction, c'est à dire ceux qui sont suffisamment exprimés de manière différente entre les deux groupes de patients pour les distinguer, sont représentés ci-contre, les gènes présents dans les 2 premiers rectangles jaunes (zones A&B) sont sur-sur-exprimés dans la FA, et ceux dans le 3ème triangle jaune (zone C) sont sous-exprimés dans la FA.

Q : N'existe-t-il pas des patients qui font des FA de manière isolée (sans Valvulopathie) ?

R : Oui, on les appelle les FA idiopathiques, qui sont souvent d'origine génétique sont rares et donc très difficiles à étudier.

On en déduit qu'il existe suffisamment de différences dans l'expression des canaux ioniques pour distinguer les deux groupes.

A partir de cela, on en a déduit le profil d'expression avec les modifications spécifiques des patients en FA.

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

Voilà les gènes dont l'expression est spécifiquement modifiée en cas de FA. On obtient ce profil après avoir enlevé les gènes dont l'expression est modifiée dans les deux profils (FA+VHD et VHD). Certains gènes présents étaient déjà connus pour être impliqués par la modification de leur expression, dans la FA. (*ex* : *Kav4.3*)

Le gène MIRP2 est également intéressant, car les patients présentant une mutation de ce gène, étaient sujets à une FA, ce qui est un argument supplémentaire de la validité de l'étude du profil d'expression des canaux ioniques dans la FA.

L'avantage des techniques de génomique ont permis de mettre en évidence le rôle d'autres gènes dont on ne se doutait pas de l'implication de leur expression dans la FA. (*ex* : *CIC6*). L'approche de génomique permet d'éviter un certain nombre d'aprioris, on ne va pas démontrer l'implication d'un gène choisi, mais on regarde tous les gènes et on voit lesquels sont impliqués.

Pour conclure, la génomique (ou la transcriptomique puisqu'il s'agit d'étudier les variations d'expression du gène au niveau ARN) permettent de déterminer le profil spécifique de syndromes, ou le profil spécifique d'action thérapeutique de molécules. Avec une approche génomique, on a pu déterminer des mécanismes jusque là inconnus.

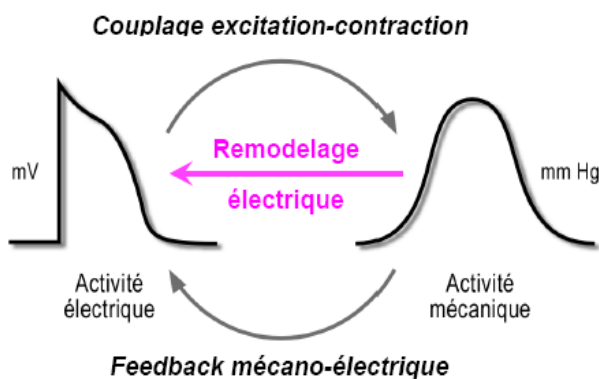
Une fois ces mécanismes et gènes élucidés, on essaie de développer des modèles transgéniques et des bloqueurs, et on vérifie si cela permet d'améliorer les symptômes...

Ces études permettent d'ouvrir des pans entiers de recherche, et développer de nouvelles molécules, enfin, ces approches de génomique peuvent être utilisées à des fins diagnostiques, notamment utiles pour le diagnostic du syndrome de Brugada, qui est difficilement diagnostiquable, avec de nombreux faux négatifs, le diagnostic est plus aisé à l'effort ou à l'aide de bloqueurs pharmacologiques des canaux sodiques, avec d'importants risques, même si l'étude du profil génomique est intéressante, elle reste risquée, puisqu'elle nécessite une biopsie.

L'étude du profil d'expression des gènes permet l'approche dans le sens « phénotype → transcription des gènes » pour s'intéresser à un phénotype électrophysiologique, et déterminer quels sont les gènes dont la transcription est altérée, mais également de comprendre comment ces gènes sont régulés et de pouvoir impacter sur le phénotype électrophysiologique (c'est à dire dans le sens « génome → transcriptome »), et il est toujours intéressant de faire un va et vient entre les deux.

IV/ STRESS MECANIQUE ET REMODELAGE ELECTRIQUE CARDIAQUE

Un autre aspect de l'étude des arythmies, c'est à dire en dehors de la génomique, permet de s'intéresser au rôle d'un stress mécanique sur les troubles du rythme. Les cas présentés précédemment, les pathologies arythmogènes entraînent une altération de la contraction cardiaque, le stress mécanique qui s'exerce sur les cellules est donc altéré.



En effet, il y a un couplage permanent entre l'activité électrique et l'activité mécanique (= *couplage excitation-contraction*), il doit y avoir un PA pour engendrer une contraction, mais il est intéressant de se demander si l'activité mécanique contrôle l'activité électrique, ce qu'on appelle le *rétro-contrôle mécano-électrique*, tout ceci étant lié. Lorsqu'il y a une force mécanique différente, cela va jouer un rôle sur l'activité électrique, et donc on cherche à comprendre comment les stimuli mécaniques, à long terme, modulent l'expression des canaux ioniques et contribuent au déclenchement d'arythmies.

Les arguments permettant de penser que l'activité mécanique a un rôle sur l'activité électrique sont nombreux.

Il est possible de synchroniser l'activité électrique en frappant fortement sur la poitrine.

Un impact mécanique violent peut générer des troubles du rythme, cela a été observé chez des joueurs de base-ball : → *l'impact électrique va modifier l'activité électrique et engendrer un trouble du rythme.*

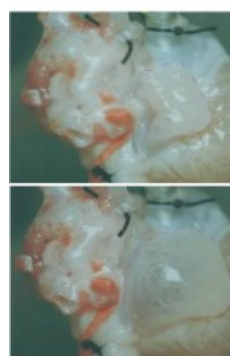
A/ Le couplage mécano-électrique

Au niveau expérimental, il est possible d'augmenter la pression intra-atriale dans des oreillettes de lapins sains.

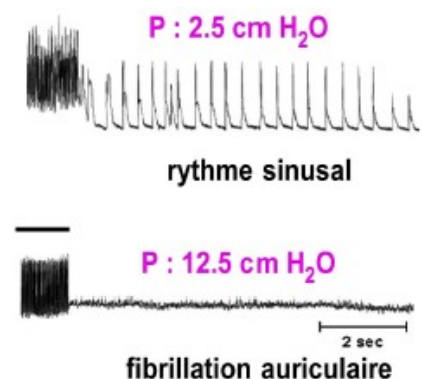
Sur les oreillettes normales, on voit qu'il y a une activité électrique avec un rythme sinusal

Mais lorsqu'on gonfle les oreillettes, l'activité électrique sera arythmogène. (FA)

Il s'agit bien d'un exemple de relation entre contrainte mécanique et activité électrique.

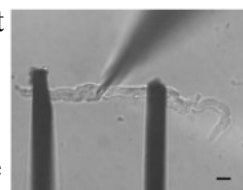


Bode et al., 2001

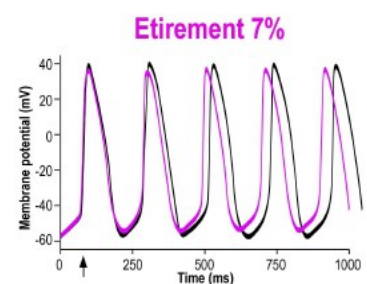


A l'échelle cellulaire, des cellules de nœud sinusal ont été isolées et maintenues entre 2 électrodes, et avec une électrode de patch pour enregistrer les PA.

On obtient la courbe noire lorsque l'étirement est normal, et lorsque étiré de 7% l'activité électrique est modifiée.

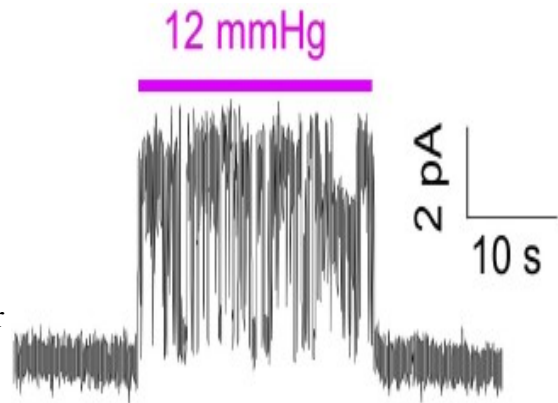


Cooper et al., 2000



Enfin, l'enregistrement ci-contre montre l'activité d'un seul canal, mesurée à l'aide d'un patch-clamp. Il existe plusieurs façons d'enregistrer des potentiels de membrane :

- soit on pose la pipette et on rompt la membrane, et on a accès à l'intérieur de la cellule, (comme un ballon relié à une tige creuse, et on déchire ce qui est à l'intérieur de la zone de contact, permettant d'avoir accès à l'intérieur du ballon.) ce qui permet d'enregistrer l'activité des canaux situés à l'intérieur de la cellule
- soit on laisse la pipette au-dessus de la membrane, permettant de mesurer l'activité des canaux à l'extérieur du morceau de membrane.

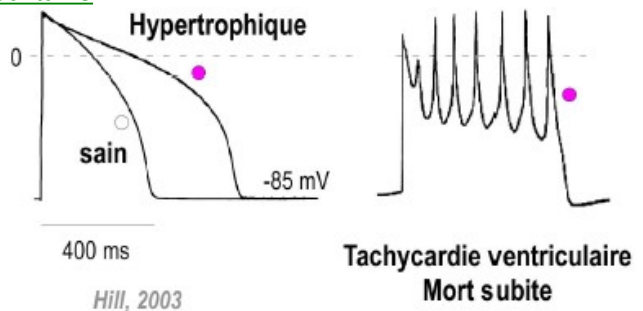


En augmentant la pression au niveau de la membrane, par aspiration, ce qui va étirer la membrane et activer le canal.

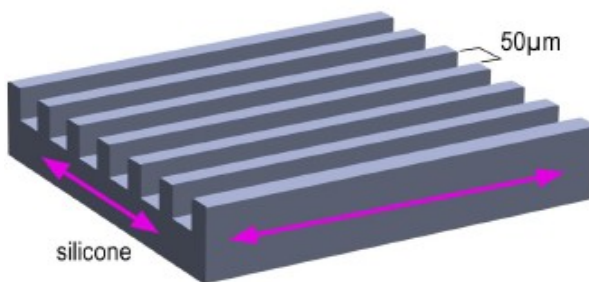
La variation de pression étant à l'origine de l'activation de ce canal.

B/ Stress mécanique et hypertrophie ventriculaire

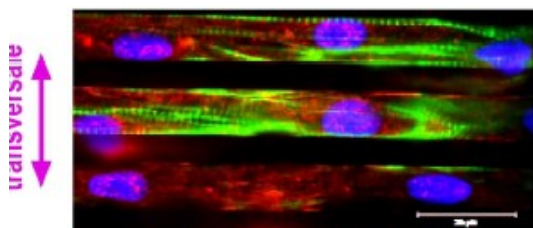
L'hypertrophie ventriculaire entraîne une surcharge de pression à l'origine d'un épaississement de la paroi ventriculaire, et donc des cellules, ce qui va entraîner un épaississement des cellules et donc des contraintes mécaniques plus importantes, ce qui va provoquer un allongement du PA et une tachycardie ventriculaire, pouvant conduire à la mort subite.



Modèle *in vitro* d'étirement biaxial



Étirement 10% génomique, IF, biochimie, physiologie



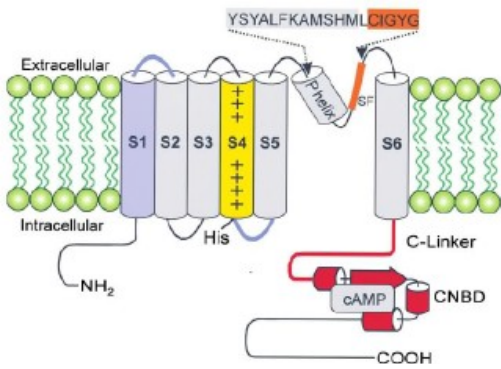
noyau, actin et FAKpY397

Senyo et al., 2007

Pour étudier ces contraintes mécaniques sur des cardiomyocytes, on utilise un système permettant de les faire pousser, avec un tampon inverse du motif présenté ci-contre, et on imprime une membrane, ce qui crée des sillons, qui ont la taille d'un cardiomyocyte, et en les mettant en culture dessus, les cardiomyocytes vont pousser et s'organiser en longueur.

Sur la photo en-dessous, on peut voir trois rangées de cardiomyocytes, avec le noyau (en bleu), l'actine (en vert) et une kinase (Focal Adhesion Kinase en rouge), ce qui permet de déformer la membrane, soit de façon transversale, soit de façon longitudinale. Ce qui permet de mesurer les effets d'une contrainte mécanique, en s'affranchissant, des autres facteurs liés à cette contrainte qu'ils soient histologiques ou hormonaux.

C/ Les canaux pacemakers HCN

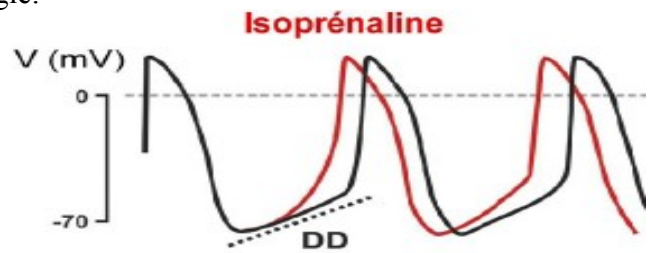


Pour relier cela aux arythmies, on va tenter de voir si les canaux HCN pacemakers sont sensibles à une activité mécanique, ils sont responsables de l'automatisme cardiaque, avec la présence d'une pente de dépolarisation diastolique, contrairement aux ventricules, qui présentent un pendant la diastole un tracé plat.

Ce sont ces canaux HCN qui sont directement responsables de cette pente de dépolarisation, sont une source importante d'arythmies et sont très peu exprimés dans les cellules atriales et ventriculaires, mais en cas de pathologie.

Ainsi, on s'est demandé si ils n'étaient pas surexprimés et ainsi responsables de la genèse de foyers ectopiques.

De nombreuses arythmies étant liées à la naissance de foyers ectopiques automatiques et liées à des contraintes mécaniques. On a voulu savoir si, l'expression des canaux HCN était modifiée par les contraintes mécaniques.



Hoesl et al., 2008

On a appliqué avec le système précédent pour mettre en culture des cardiomyocytes et leur appliquer des contraintes mécaniques, et on a mesuré l'expression des canaux. Il existe plusieurs sous-unités au sein des canaux HCN (les plus exprimés étant HCN2 et HCN4), et lorsque l'on applique une contrainte transversale il y a une modification de l'expression d'HCN2 et d'HCN4, mais pas la contrainte longitudinale.

Ce qui a des conséquences physiopathologiques, puisque, les cardiomyopathies avec une augmentation de la taille du ventricule gauche mais sans épaissement de la paroi, ou cardiomyopathies dilatées, sont très peu arythmogènes. (→ contraintes dans le sens de la paroi)

A l'inverse les cardiomyopathies hypertrophiques sont très arythmogènes (→ contraintes longitudinales et transversales).

Ce qui peut-être à l'origine de l'apparition de foyers arythmogènes.

