UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Nadjet BELBACHIR

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *Biologie Santé)*

Discipline : *Physiologie cardiovasculaire*
Spécialité : *Electrophysiologie cardiovasculaire*
Unité de recherche : *l'institut du thoraxe UMR 1087*

Soutenue le : 02 Octobre 2017
Thèse N° :

Mécanismes physiopathologiques du syndrome de Brugada

Caractérisation fonctionnelle d'un nouvel acteur : Rad GTPase

JURY

Président du jury	**Patricia LEMARCHAND,** Professeure des Universités - Praticien hospitalier**,** Université de Nantes
Rapporteurs :	**Ana-Maria GOMEZ**, Directrice de Recherche Inserm, Université Paris-Sud **Jérémy FAUCONNIER**, Chargé de Recherche CNRS, Université de Montpellier
Examinateurs :	**Elise BALSE,** Maitre de Conférence des Universités universitaire, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6 **Albano MELI**, Chargé de Recherche Inserm, Université de Montpellier **Jean-Sébastien HULOT**, Professeur des U²niversités - Praticien hospitalier, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
Directeur de Thèse :	**Flavien CHARPENTIER**, Directeur de Recherche Inserm, Université de Nantes

Table des matières

Liste des figures

Liste des Tableaux

Abréviations

Avant-propos

Objectifs de la thèse

Introduction

1. Fonction et structure cardiaque 1

1.1. Généralités : 1

1.2. Structure du cœur : 1

1.3. Activité électrique cardiaque : 2

2. Les troubles du rythme cardiaque : 7

2.1. Présentation des troubles du rythme cardiaque : 7

2.2. Le syndrome de Brugada : 8

3. La protéine Rad GTPase 25

3.1. Les protéines G : 25

3.2. Les protéines G monomériques : 25

3.3. La famille des Ras : 27

3.4. La sous-famille des RGK 30

3.5. La protéine G monomérique Rad : 32

4. Les cardiomyocytes dérivés d'IPSC : 43

4.1. Les cellules souches : 43

4.2. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC : 46

Matériel et méthodes

1. Modèle de cardiomyocytes de souris nouveau-nées : 57

1.1. Isolement des cardiomyocytes : 57

1.2. Infection adénovirale : 58

1.3. Validation du modèle : 59

2. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC : 64

2.1. La reprogrammation : 64

2.2. La différenciation en cardiomyocytes : 64

2.3. La dissociation : 64

3. Patch-clamp : 65

4. Les immunomarquages : 66

5. La RT-Q-PCR : 69

5.1. Extraction d'ARN 69

5.2. La rétrotranscription 69

5.3. Contrôle qualité : 70

5.4. La PCR quantitative 70

6. Quantification des protéines : 71

6.1. Extraction de protéines totales 71

6.2. Dosage des protéines 73

6.3. Western Blot 73

7. Le modèle de souris Knock In Rad R210H : 75

7.1. Caractérisation électrophysiologique : 76

7.2. Etude de l'expression de la protéine Rad : 77

7.3. Caractérisation de la structure cardiaque : 77

Article principal

Résultats supplémentaires

1. Caractérisation dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées : 142

1.1. Le cytosquelette d'actine : 142

1.2. Les points focaux d'adhésion : 142

1.3. Les jonctions intercellulaires : 143

2. Investigation du variant Rad p.R211H dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC : 147

2.1. Le courant sodique: 147

2.2. Localisation subcellulaire de Rad dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC..... 150

2.3. Les microtubules :..... 152

3. Caractérisation de la souris Rad R210H :..... 153

3.1. Caractérisation électrophysiologique :..... 153

3.2. Distribution de l'expression de la protéine Rad et Nav1.5 dans les cœurs des souris WT et KI R210H :..... 155

3.3. Expression de la protéine Rad en fonction de l'expression de la protéine Nav1.5 : 157

3.4. Caractérisation de la structure cardiaque chez les souris KI R210H :..... 157

Discussion complémentaire et perspectives

1. Discussion : 161

2. Perspectives : 170

Sur le plan moléculaire :..... 170

Sur le plan fonctionnel :..... 171

3. Conclusion 173

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : *Activité électrique du coeur au sein des différents tissus et compartiments ainsi que les courants ioniques associés.* ____ 4

Figure 2 : *Propagation de d'l'influx électrique dans le cœur.* ____ 5

Figure 3 : *Signature ECG du syndrome de Brugada.* ____ 10

Figure 4 : *La théorie de la dépolarisation du syndrome de Brugada.* ____ 14

Figure 5 : *l'hypothèse de la repolarisation du syndrome de Brugada.* ____ 16

Figure 6 : *Développement cardiaque.* ____ 20

Figure 7 : *Le connexome des disques intercalaires du tissu cardiaque.* ____ 23

Figure 8 : *La superfamille des protéines G monomériques RAS.* ____ 26

Figure 9 : *Structure tridimensionnelle de la protéine G monomérique de la famille des Ras.* 28

Figure 10 : *Régulation du cycle d'hydrolyse du GTP par les GTPases.* ____ 29

Figure 11 : *Voies de signalisations impliquant Rad dans le cardiomyocyte.* ____ 36

Figure 12 : *Implication de Rad dans la voie de signalisation Rho/ROCK.* ____ 38

Figure 13 : *Sites d'interaction et de phosphorylation des différents partenaires protéiques de Rad.* ____ 40

Figure 14 : *étapes d'obtention de cellules différenciées à partir de cellules souches pluripotentes induites.* ____ 45

Figure 15 : *Différenciation cardiaque à partir de cellules iPS.* ____ 48

Figure 16 : *Résultats des expérimentations d'xCELLigence®* ____ 62

Figure 17 : *Quantification d'ARN messager du gène Rad murin et humain dans les cardiomyocytes.* ____ 63

Figure 18 : *Augmentation de la circularité des cardiomyocytes infectées avec le variant Rad R211H.* ____ 144

Figure 19 : *Les points focaux d'adhésion dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées.* 145

Figure 20 : *La N-Cadhérine dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées.* ____ 146

Figure 21 : *Paramètres du courant I_{Na} dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.* ____ 148

Figure 22 : *Le courant sodique persistant dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.* 149

Figure 23 : *Localisation subcellulaire de la protéine Rad dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.* ____ 151

Figure 24 : *La tubuline dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.* _____ *152*

Figure 25 : *Caractérisation électrophysiologique des souris KI R210H.* _____ *154*

Figure 26 : *Variations d'expression protéique de Rad et Nav1.5 dans les cœurs des souris WT et KI R210H.*_____ *156*

Figure 27 : *Expression de Rad et CTGF dans les cœurs des souris sauvages et Scn5a$^{+/-}$.* ___ *158*

Figure 28 : *Etude de la fibrose cardiaque au sein des cœurs de souris WT et KI R210H.* ___ *159*

Figure 29 : *Potentiels d'actions des CM-iPSC différenciés de patients porteurs d'autres variants génétiques liés au syndrome de Brugada (BrS).* _____ *164*

Figure 30 : *schéma bilan de l'ensemble de la caractérisation électrique et structurale du phénotype induit par le variant Rad p.R211H.* _____ *169*

Liste des tableaux

Tableau 1 : *Répartition des principaux gènes impliqués dans la génération et la conduction de l'influx électrique* _____ *6*

Tableau 2 : *Classification des gènes impliqués dans le syndrome de Brugada* _____ *12*

Tableau 3 : *Implication des facteurs de transcription au cours du développement cardiaque* _____ *21*

Tableau 4 : *Expression tissulaire et rôle des membres de la famille des protéines RGK* ____ *31*

Tableau 5 : *Similitudes et différences entre les CM-iPSC et les CM adultes* _____ *47*

Tableau 6 : *les CM-iPSC en tant que modèle d'étude de 8 pathologies rythmiques publiées.* *51*

Tableau 7 : *composition des milieux de culture des cardiomyocytes de souris nouveau-nées* *58*

Tableau 8 : *conditions de culture des cardiomyocytes de souris nouveau-nées infectés selon les expérimentations* _____ *58*

Tableau 9 : *conditions d'infection des cardiomyocytes de souris néonatales* _____ *59*

Tableau 10 : *Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expérimentations d'immunomarquage* _____ *68*

Tableau 11 : *Composition du mélange et programme d'amplification de la rétrotranscription* _____ *70*

Tableau 12 : *composition des tampons de lyse* _____ *72*

Tableau 13 : *Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les experimentations de Western Blot* _____ *75*

Tableau 14 *: Résultats des expérimentations de stimulation ventriculaire programmée* __ *155*

Abréviations

SNPs : Single Nucleotide Polymorphisme

ARVC : dysplasie arythmogène du ventricule droit

ECG : Electrocardiogramme

NaV1.5 : sous-unité α du canal sodique cardiaque voltage-dépendant

Ito : Courant potassique transitoire repolarisant

SCN5A : gène codant pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque NaV1.5

SCN10A : Sous-unité α du canal sodique NaV1.8

GPD1L : Glycerol-3-phosphate déshydrogénase 1-like protéine

SCN1B : Sous-unité β 1 du canal sodique NaV1.5

SCN2B : Sous-unité β 2 du canal sodique NaV1.5

SCN3B : Sous-unité β 3 du canal sodique NaV1.5

RANGRF : Facteur de libération du nucléotide guanine de Ran

SLMAP : Protéine associée à la membrane du sarcolemme

PKP2 : Plakophiline 2

CACNA1C : Sous-unité α 1c du canal calcique de type L CaV1.2

CACNB2B : Sous-unité β 2 du canal calcique de type L CaV1.2

CACNA2D1 : Sous-unité α2/δ1 du canal calcique de type L CaV1.2

TRPM4 : Membre 4 de la sous famille des canaux cationiques non sélectifs

KCND3 : Membre 3 de la sous-famille D des canaux potassiques voltage-dépendants

KCNE3 : Membre 3 de la sous-famille E des canaux potassiques voltage-dépendants

KCNJ8 : Canal potassique rectifiant 8 ATP-sensible entrant

HCN4 : Canal potassique/sodique dépendant des nucléotides cycliques sensible à l'hyperpolarisation

KCNE5 : Sous-unité β 5 des canaux potassiques voltage-dépendants de la sous-famille E

KCND2 : Membre 2 de la sous-famille D des canaux potassiques voltage-dépendants

ABCC9 : Membre 9 de la sous famille des récepteurs à l'ATP

FGF12 : Facteur de croissance fibroblastique

SEMA3A : Semaphorine 3

SLMAP : Protéine associée au sarcolemme

RVOT : la chambre de chasse du ventricule droit

INa : Courant sodique généré par les canux sodique NaV

RV/VD : ventricule droit

LV/VG : ventricule gauche

RA/OD : oreillette droite

LA/OG : oreillette gauche

ERS : syndrome de la repolarisation précoce

QRS : intervalle ECG correspondant à la phase de la dépolarisation ventriculaire

QT : intervalle ECG entre la fin de la dépolarisation et al fin de la repolarisation ventriculaire

QTc : intervalle ECG entre la fin de la dépolarisation et al fin de la repolarisation ventriculaire rapporté à la fréquence cardiaque

ST : intervalle ECG entre la fin de la dépolarisation et le début de repolarisation ventriculaire

Onde T : onde ECG correspondant à la repolarisation ventriculaire

Epi : epicarde

Endo : endocarde

FHF : premier champs cardiaque dans le feuillet du mésoderme

SHF : second champs cardiaque dans le feuillet du mésoderme

ISLET 1 : Facteur de transcription de la famille des LIM

TBX : Facteurs de transcription de la famille des T-box

Cx40, 43, 45 : Connexines de 40, 43 et 34 kDa

Hand 1 et 2 : Heart And Neural Crest Derivatives Expressed *1 et 2*

Sema6d : Semaphorine 6

Plxna1 : Plexine 1

Kv4.3 : membre de la famille des canaux Kv4 qui génèrent le courant potassique transitoire Ito

RGK : Rad, Gem, Kir

Ras : Rat sarcoma protein

Ran : RAs-related Nuclear protein

Rab : Ras-like protein in rats Brain

Rho :Ras Homologue proteins

Arf : ADP ribosylation factor

GDP : Nucléotide guanilique bi-phosphate

GTP : Nucléotide guanilique tri-phosphate

GTPase : protéines qui hydrolysent le GTP

GEF : Facteur d'échange des nucléotides guaniliques au sein des protéines GTPase

GAP : Facteur d'acyivation des protéines GTPase

GDI : guanine Dissociation inhibitor

HVR : high Variable Region

CAV1.2 : sous unité α des canaux calciques de type L

CaVβ : sous unité β régultarice des canaux calciques de type L

Rad : Ras associated with diabetes

RRAD : gene codant pour la protéine Rad

Gem : GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle

Rem/Rem 2 : RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding

RS : Reticulu Sarcoplasmique

CamKII : Calmoduline Kinase II

Cam : Calmoduline

PKA : Proteine Kinase A

PKC : Proteine Kinase C

RYR 2 : recepteur à la Ryanodine de type 2

14-3-3 : “14th fraction of bovine brain homogenate on positions 3.3 of subsequent electrophoresis” en chromatographie liquide

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

C/EBP-δ : CCAAT/enhancer-binding protein delta

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

ATF : Activating transcription factor

BcL-2 : B-cell lymphoma 2

ROCK : Rho kinase

DMPK : Dystrophy Myotonic Protein Kinase

DRCK : Kinase reliée au CDC-42

MLC : Myosin Light Chain

MBS : myosin binding subunit

Myr 5 : Myosin Rat

GLUT4 : Glucose Transporter 4

NF-$_k$B : nuclear factor-kappa B

RelA/P65 : Rel-like domain-containing proteins

MMP9 : Matrix Metalloproteinase 9

Rap1B : Receptor-associated protein

CKII : Casein Kinase II

Ser : Serine

PIP : Phosphatidyl Inositol Phosphate

MyoD : Myogenic Differenciation

MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C

MyF-5 : Myogenic Factor 5.

KO : Knock Out

KI : Knock In

I_{to} : courant potassique transitoire

hES : human Ebryonic Stemcell

iPSC : induced Pluripotent Stem Cells

KLF4 : Kruppel-like factor 4

OCT3/4 : octamer-binding transcription factor 4

SOX2 : SRY (sex determining region Y)-box 2

C-Myc : oncogenic transcription facto

CPP : Cell Penetrating Peptides

TRA1-60 : antigene membranaire du carcinoma humain

SSEA-1 : Stage-specific embryonic antigen-1

TGFβ : Transforming growth factor beta

Wnt : glycoproteines intervenat dans l'embryogenese de la famille WINT pour : *wingless* Integration site

FGF : Fibroblast Growth Factor

CICR : Calcium Induced Calcium Release

IKr : courant potassique rapide

IKs : courant potassique lent

IK1 : courant potassique rectifiant

CPVT : tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique

EAD : Early After Depolarization

LQT : Long QT sybdrome

TALENs : Trascription Activator-like Effector Nucleases

ZFN : Zinc-Finger Nucleases

CRISPR : Clustered Resgulatory Interspaced Short Palindromic Repeats

CasQ2 *:* Calsequestrin 2

PKP2 *:* Placophiline 2

IP3 : Inositol Triphosphate

Avant-propos

Aux prémices de l'évolution, l'approvisionnement des cellules se faisait par diffusion passive à travers les parois d'une couche cellulaire simple. Le système circulatoire est apparu avec les premiers organismes multicellulaires qui ont rendu cette diffusion simple des nutriments et de l'oxygène insuffisante. Chez ces organismes, le cœur n'est qu'un vaisseau musculeux qui véhicule le sang dans un trajet cyclique en circuit clos par la contraction des muscles périphériques. La nécessité d'une double circulation a vu le jour au moment où les premiers amphibiens sont apparus. Ce passage vers la vie terrestre provoque un remaniement profond dans l'anatomie cardiaque et le développement des poumons bien que rudimentaires change l'orientation du tube primitif cardiaque. Le développement de la petite et de la grande circulation nécessite une segmentation des cavités cardiaques en chambres séparées destinées à traiter les deux circulations séparément, et le développement de propriétés contractile complexes. L'homme possède l'appareil cardiovasculaire le plus évolué du règne animal avec un système hydraulique composé d'artères et de veines qui commence et se termine par une pompe : le cœur. Le rythme cardiaque orchestre les battements du cœur dès la première impulsion électrique détectée au cours de la 4ème semaine du développement embryonnaire et ne s'arrête qu'au moment de la mort. Comme pour n'importe quel autre rythme physiologique, celui-ci met en jeu un réseau complexe de protéines. Leur fonction consiste à émettre, transmettre et traduire cette activité électrique en activité mécanique

L'équipe du Dr Flavien Charpentier à l'institut du thorax, s'intéresse aux mécanismes physiologiques et physiopathologiques qui gouvernent le rythme cardiaque et ses troubles. Conjointement avec l'équipe de génétique de l'institut, plusieurs études de caractérisations gène-fonction ont été accomplies au cours des dernières années, permettant d'une part d'identifier l'implication de nouveaux gènes dans des pathologies rythmiques non élucidées et d'autre part, de contribuer à la caractérisation plus fondamentale de la fonction électrique cardiaque. Le syndrome de Brugada a toujours suscité un intérêt particulier au sein du domaine de l'électrophysiologie cardiaque et ce à cause de sa complexité génétique et fonctionnelle, complexité qui réside principalement dans le fait que la plupart des cas atteints n'ont pas d'origine génétique déterminée. La découverte d'un nouveau gène potentiellement impliqué dans cette pathologie, le gène RRAD, a donné lieu aux travaux décrits dans la présente thèse.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail a été de déterminer l'implication du produit protéique du gène RRAD dans l'apparition du syndrome de Brugada chez les patients porteurs du variant p.R211H et de définir le rôle physiologique de la protéine Rad dans la fonction cardiaque.

A ce jour, quelques études ont décrit Rad comme étant impliquée dans des voies de signalisation régissant des aspects électrophysiologiques tels que la régulation des canaux calciques du type L mais aussi la structure cellulaire en interférant dans la voie Rho/Rhokinase. Etant donné le peu de données reportées sur Rad dans la fonction cardiovasculaire, le premier objectif de la caractérisation du variant Rad p.R211H, a été de déterminer le rôle de Rad sous sa forme sauvage dans les cardiomyocytes sur les deux aspects : électrique et structural. Ainsi, Rad et sa forme mutée (p.R211H) ont été surexprimés au sein de cardiomyocytes de souris nouveau-nées et l'effet de cette surexpression a été étudié sur le plan électrophysiologique et structural. Puis, l'impact du variant p.R211H sur les fonctions de Rad a été étudié en différenciant des cardiomyocytes à partir de cellules iPS reprogrammées du patient porteur du variant. Ces deux modèles ont permis de dresser le tableau de la fonction primaire de Rad puis la conséquence fonctionnelle de la mutation sur le plan structural et électrique au niveau cellulaire. Un modèle murin Knock in (KI) de la mutation p.R210H a ensuite été étudié afin d'établir les conséquences du phénotype cellulaire du variant au niveau de l'organe entier et à l'échelle de l'organisme.

Cette étude s'inscrit dans un plus grand projet qui se dessine au sein de l'institut par l'inclusion d'autres études de mutations impliquées dans le syndrome de Brugada. Le but ultime est d'identifier une signature physiologique commune à ces mutations portées sur des gènes différents mais qui mènent tout de même au même phénotype.

Introduction

1. Fonction et structure cardiaque

1.1. Généralités :

Le cœur est un organe creux quadri-cavitaire qui forme le début et la fin du système cardiovasculaire dont le rôle est de garantir l'acheminement rapide des nutriments et de l'oxygène vers les organes par le sang. Ce système est constitué de deux réseaux de vaisseaux complémentaires : la grande et la petite circulation. La grande circulation est responsable de l'irrigation des organes périphériques par les artères. Les déchets produits par le métabolisme des différents organes sont collectés par les veines qui réacheminent le sang vers le cœur. Celui-ci propulse ce sang pauvre en oxygène vers les poumons où il va être en contact avec les alvéoles chargées en oxygène puis retournera vers le cœur par les veines pulmonaires ; ce circuit constitue la petite circulation.

1.2. Structure du cœur :

Le cœur comporte deux oreillettes qui débouchent sur deux ventricules positionnés symétriquement de part et d'autre du septum formant ainsi ce qu'on appelle communément le cœur « droit » et le cœur « gauche ». De chaque côté, des valves séparent les ventricules des oreillettes permettant un cloisonnement parfait des cavités lors de la contraction et du remplissage cardiaque. Cette fonction pompe est assurée grâce à l'association des propriétés mécaniques et électriques du cœur. Ces deux forces régissent les battements cardiaques dans un rythme constant, d'abord en contractant les oreillettes qui éjectent le sang dans les ventricules puis en contractant ces derniers qui propulsent le sang vers l'aorte et le tronc pulmonaire.

La paroi cardiaque est constituée principalement de trois tuniques tissulaires qui s'alternent avec des feuillets matriciels conférant au cœur l'élasticité nécessaire pour se contracter. L'épicarde représente à la fois la couche externe de la paroi cardiaque et le feuillet viscéral du péricarde, il est constitué de cellules épithéliales et de fibres élastiques. L'endocarde tapisse la face interne des cavités et est composé majoritairement de cellules endothéliales. Entre les deux, le myocarde est responsable de la contraction des cavités grâce aux cardiomyocytes qui sont des cellules de grande taille dotées d'un cytosquelette très dense qui leur permet d'avoir une activité contractile. Sous l'épicarde, les cardiomyocytes forment une structure compacte et maintiennent une orientation linéaire avec la paroi ventriculaire

pour former la couche sous-épicardique. Dans la couche « sous-endocardique», l'orientation des cardiomyocytes change progressivement pour se diriger vers l'intérieur de la cavité ventriculaire afin de constituer les trabécules ventriculaires.

De par sa fonction principale qui est la circulation, le cœur assure le rôle de distribution et d'acheminement des hormones et des enzymes sécrétées ainsi que les cellules du système immunitaire vers leurs cibles. Sa capacité d'adapter le rythme des battements aux besoins métaboliques des différents organes permet d'assurer un débit sanguin constant pour une perfusion efficace en toute circonstance à l'effort comme au repos, à jeun ou en postprandial. Ainsi le cœur assure la stabilité d'une homéostasie dont l'équilibre repose sur la régulation de son rythme.

1.3. Activité électrique cardiaque :

Le rythme cardiaque dépend d'un équilibre très fin qui repose sur l'homéostasie des différents ions (Calcium, Sodium, Potassium…etc.) présents de part et d'autre de la membrane des cardiomyocytes. Ces ions traversent la membrane par des complexes protéiques appelés canaux ioniques. Chaque type d'ion est véhiculé par un canal propre et ce grâce à un filtre de sélectivité présent au niveau du port du canal. Le passage des ions de part et d'autre de la membrane plasmique génère un courant électrique entrant ou sortant selon le gradient électrochimique de l'ion. Les canaux ioniques présents à la membrane plasmique des cardiomyocytes peuvent être régulés par différents phénomènes tels que l'étirement des cellules, un agoniste, les variations de température ou de pH mais aussi par les variations du potentiel électrique de la membrane. Ces canaux sont dits « Voltage-dépendants » et vont être les principaux acteurs de la génération d'un potentiel d'action qui engendre une contraction cellulaire. La somme des contractions de chaque cellule aboutit à la contraction du cœur. Les cardiomyocytes battent de façon synchrone grâce aux jonctions *gap*. Ces structures multi protéiques composées de connexines permettent le passage des ions d'une cellule à l'autre et donc le potentiel d'action qui va déclencher la contraction des cellules de proche en proche.

Les canaux ioniques voltage-dépendants exprimés au niveau cardiaque se déclinent en différentes familles en fonction du type d'ion qu'ils véhiculent : les canaux sodiques (Nav), calciques (Cav) et potassiques (Kv). Des familles de canaux avec une sélectivité moins spécifique telles que les canaux à protons (Hv) et les canaux à cations (HCN) sont aussi

présentes. De par les courants ioniques qu'ils génèrent, ces complexes macromoléculaires jouent un rôle clé dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action cardiaque. Le potentiel de membrane au sein des cardiomyocytes au repos est maintenu à -80 mV environ grâce au courant potassique I_{K1}, généré par les canaux potassiques à rectification entrante (*inward rectifier*) Kir2.1, Kir2.2 et, dans une moindre mesure, Kir2.3, et grâce à l'action de la pompe Na^+/K^+ ATPase exprimée au niveau du sarcolemme. Ceux-ci contrebalancent largement l'activité des canaux sodiques Nav1.5 qui n'est pas nulle et dont la vitesse d'entrée d'ions à ce potentiel est estimée à 1mM/min. Au cours de la dépolarisation d'un cardiomyocyte déclenchée par la propagation des potentiels d'action en amont, le courant I_{K1} diminue et les canaux sodiques s'activent et s'inactivent rapidement triplant leur vitesse de conduction d'ions, générant un courant sodique entrant transitoire très ample. Cette entrée massive de sodium déstabilise la polarité membranaire, la faisant atteindre un potentiel environnant les +20 mV. Bien que très rapide (2 à 3 ms), cette phase de dépolarisation traverse le seuil de potentiel d'activation d'autres canaux voltages dépendants, notamment les canaux potassiques repolarisants transitoires I_{to} et les canaux calciques dépolarisants Cav1.2, initiant ainsi deux phases du potentiel d'action : la repolarisation précoce et le plateau. La phase de plateau est le résultat de l'installation d'un équilibre dynamique résultant en grande partie du courant calcique de type L qui est dans sa gamme de potentiel optimale, mais aussi de l'inactivation du courant sodique qui est plus lente et qui comprend une composante dite « persistante » qui va maintenir le potentiel entre 10 et 20 mV. Cette phase de plateau se maintient aussi grâce à l'action de l'échangeur Na^+/Ca^{++} dont le sens de l'échange dépend du gradient de concentration des deux ions dans le cardiomyocyte. Enfin, les canaux potassiques KCNQ1 et hERG s'activent générant les courants repolarisants I_{Ks} et I_{Kr} qui ramènent le potentiel de membrane du cardiomyocyte à des potentiels avoisinant les -80 mV (Marban, 2002).

L'allure du potentiel d'action cardiaque respecte ces 5 phases quelque soit le compartiment cardiaque ou le type cellulaire dans lequel il est enregistré. Néanmoins, des signatures tissulaires et cellulaires ont pu être distinguées entre les couches sous endocardique, myocardiques et sous-épicardiques mais aussi entre les compartiments atriaux, ventriculaires et nodaux. Les potentiels d'action auriculaires et ventriculaires sont dits « sodiques » car leur dépolarisation dépend essentiellement de l'activation des courants

Nav1.5. La dépolarisation du potentiel d'action nodal dépend en grande partie du courant calcique. Ceci est dû à la faible expression des canaux Kir2.x dans ces cellules et à l'expression des canaux HCN4 responsables de la génération du courant I_f dit courant « pacemaker » qui empêchent l'établissement d'un potentiel de repos à -80 mV essentiel à l'activation optimale des courants sodiques Nav1.5. Cette hétérogénéité de potentiel d'action est importante et assure une activité électrique hiérarchisée et synchrone (Figure 1).

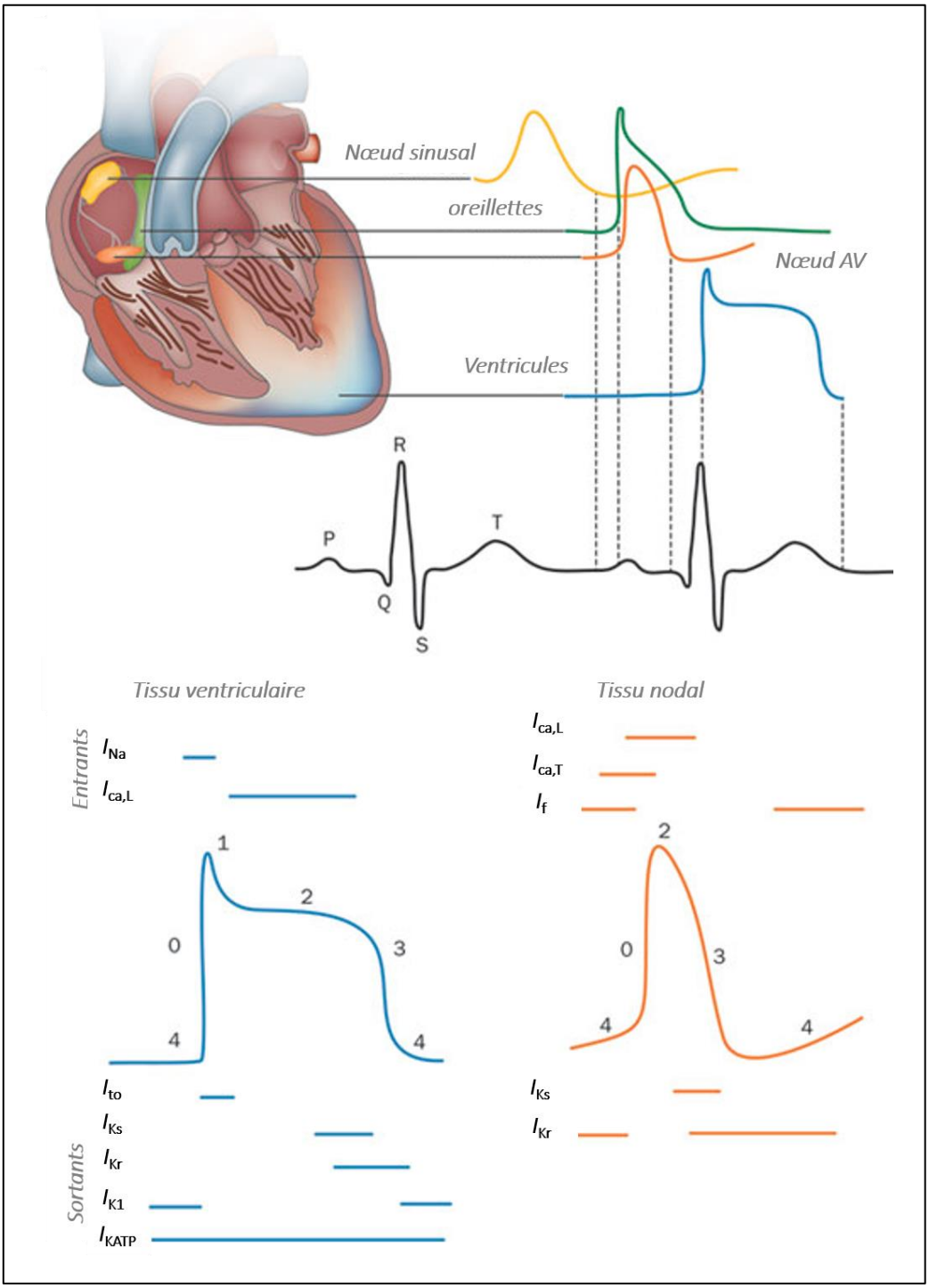


Figure 1 : Activité électrique du cœur au sein des différents tissus et compartiments ainsi que les courants ioniques associés. *Guidicessi JR et al., 2012*

Ainsi l'activité électrique cardiaque nait au niveau du nœud sinusal qui compte des cellules dites « automatiques » responsables de la génération de la première impulsion électrique qui va d'abord se propager au niveau de la paroi auriculaire. Le nœud sinusal est situé au niveau de l'oreillette droite, en amont du nœud auriculo-ventriculaire qui est le deuxième relais de cette impulsion. Celui-ci a pour rôle de ralentir la propagation électrique pour assurer le délai entre la contraction auriculaire et ventriculaire. L'influx poursuit ensuite son chemin à travers le septum par le faisceau de His et stimule les parois ventriculaires en se propageant dans les fibres de Purkinje. L'ensemble de ces éléments constitue le tissu nodal qui règne en chef d'orchestre sur le rythme cardiaque (figure 2).

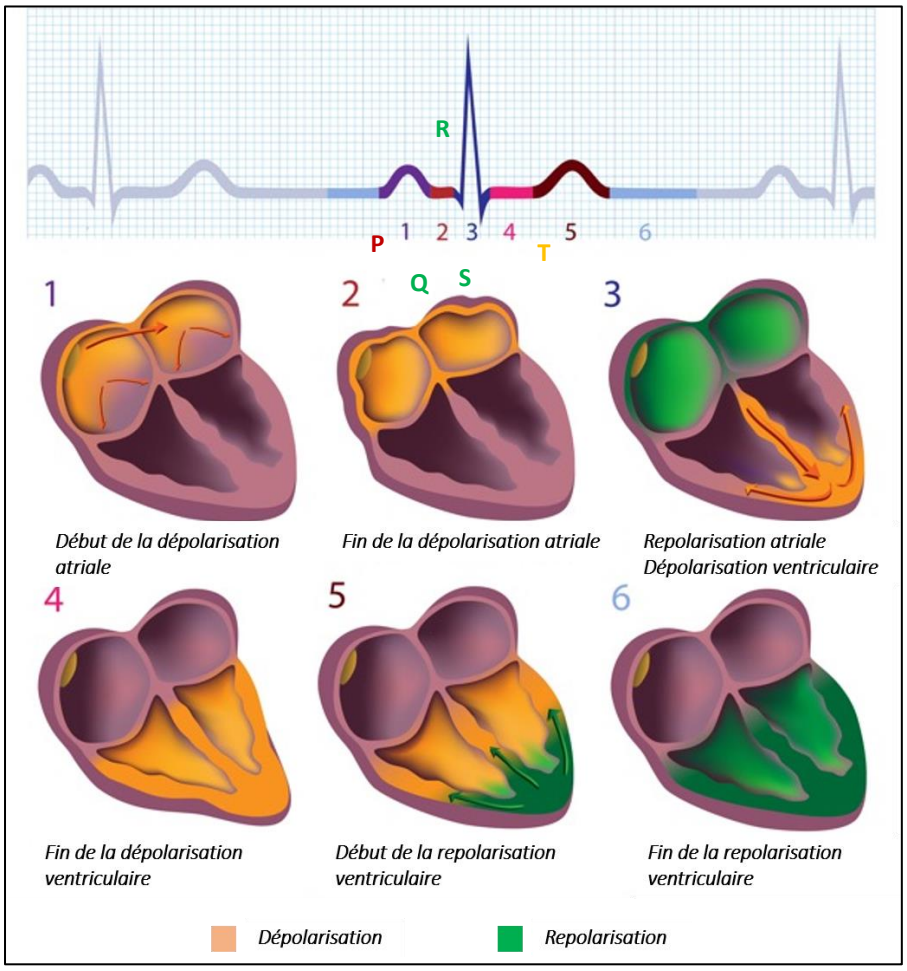


Figure 2 : Propagation de d'l'influx électrique dans le cœur.

Étapes de la propagation de la dépolarisation et de la repolarisation cardiaque dans les différents compartiments du cœur.

La morphologie du cœur et son architecture tissulaire jouent un rôle clé dans son activité électromécanique qui repose sur un équilibre constant entre l'exigence du rythme cardiaque et la capacité du muscle à se contracter. L'organisation des parois libres des ventricules en myocarde sous-épicardique et myocarde sous-endocardique qui possèdent chacun un

potentiel d'action distinct, permet d'assurer une hiérarchie dans la contraction des chambres ventriculaires, et ce grâce à une expression des canaux ioniques et des connexines en gradient à travers les parois (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des principaux gènes impliqués dans la génération et la conduction de l'influx électrique dans les compartiments tissulaires cardiaques *(d'après Boukens et al., 2006)*

	Protéines	*Gène codant*	*Distribution*	*Espèce*
Canaux ioniques	I_{Na}			
	Nav1.5	SCN5A	Epi ▶ Endo	Humain, Rat, souris
	I_{to}			
	Kv4.2	KCND2	Epi ▶ Endo	Humain, chien, souris, cobaye
	Kv4.3	KCND3	VG ◀ VD	Humain, chien
	KChiP2	KCNIP2	Epi ▶ Endo VG ◀ VD Apex ◀ Base	Humain, chien Chien Humain, chien
	I_{Ks}			
	KvLQT1	KCNQ1	Epi ▶ Mid VG ◀ VD Apex ◀ Base	Humain, chien Chien Humain, chien
	MinK	KCNE1	Epi ◀ Mid VG ◀ VD Apex ◀ Base	Humain, chien Chien Humain, chien
	I_{Kr}			
	HERG	KCNH2	Epi ▶ Mid	Humain
	MiRP-1	KCNE2	Epi ▬ Mid	Humain, chien
Connexines	Cx43	GJA1	Epi ◀ Endo VD ▶ RVOT	Chien Lapin
	Cx40	GJA5	Epi ◀ Endo	Souris

Abréviations. Endo : myocarde sous-endocardique ; Epi : myocarde sous-épicardique ; Mid : couche profonde du myocarde ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche ; RVOT : chambre de chasse du ventricule droit (Right Ventricular Outflow Tract)

2. Les troubles du rythme cardiaque :

2.1. Présentation des troubles du rythme cardiaque :

Les troubles du rythme cardiaque sont communément dus à la perturbation de l'ordre de propagation électrique établi par le tissu nodal. On distingue les troubles primaires sans cardiopathie sous-jacente dus à une perturbation de l'homéostasie ionique (canalopathie, remodelage électrique), des troubles du rythme causés par une lésion tissulaire au sein du myocarde (ischémie) [Rubart & Zipes, 2008], ou à une maladie structurale cardiaque (cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique, dysplasie arythmogène du ventricule droit…) [Roberts & Brugada 2003]. Ces perturbations des battements du cœur peuvent être complètement asymptomatiques comme ils peuvent mener à la mort subite cardiaque en provoquant une fibrillation ventriculaire, torsade de pointes et arrêt cardiaque. Une bradycardie majeure due à un problème de conduction cardiaque peut aussi être un déclencheur. Par ailleurs, une perturbation de la régulation adrénergique ou muscarinique de l'activité électrique cardiaque par le système nerveux autonome peut provoquer l'apparition d'évènements arythmiques comme chez les patients atteints de tachycardies ventriculaires catécholergiques polymorphes [Wang *et al*., 2017].

La mort subite cardiaque touche environ un individu sur mille par an dans la population générale est responsable de 15 à 20% de la mortalité globale. La mort survient généralement dans l'heure qui suit l'apparition des premiers symptômes et le taux de survie est inférieur à 3% (mort subite récupérée) [Deo and Albert, 2012].

Environ 5 à 10% des cas de mort subite sont attribués aux troubles du rythme sans cardiopathie sous-jacente. Leur développement peut être dû à des variants génétiques rares à effets majeur, les mutations, mais aussi à des polymorphismes communs tels que les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme) [Bezzina *et al*., 2013]. La compréhension de l'expressivité de ces modifications du génome est donc déterminante pour pouvoir les lier aux manifestations phénotypiques telles que les troubles du rythme. En effet, une expression différentielle des canaux ioniques peut dépendre du sexe, de l'âge ou de l'origine ethnique [Becker *et al*., 1993 ; Kharn *et al*., 2004 ; Zipes *et al*., 2006]. Par exemple, on remarque une disparité de la pénétrance ainsi qu'une variabilité de la gravité du phénotype en particulier pour le syndrome du QT long congénital et le syndrome [Albert *et al*., 2008].

Ces observations montrent la complexité de la régulation des acteurs intervenant dans l'activité électrique cardiaque et le remodelage potentiel qui pourrait être engendré en cas d'anomalie.

2.2. Le syndrome de Brugada :

2.2.1. Découverte :

Le syndrome de Brugada a été mis en évidence en 1992 par les frères Josep et Pedro Brugada sur huit patients qui présentaient un bloc de branche droite avec une sus-élévation du segment S-T sur les dérivations précordiales droites de l'ECG de surface. Ces patients avaient des antécédents familiaux de mort subite cardiaque suggérant un caractère héréditaire de la pathologie et un cœur structurellement sain [Brugada *et al.*, 1992]. Les années qui suivirent la découverte du syndrome de Brugada furent marquées par la controverse : en effet, beaucoup de similitudes de phénotype ont été reliées à un autre syndrome du cœur droit avec la même signature ECG mais avec des perturbations structurales, la dysplasie arythmogène du ventricule droit (ARVC) [Corrado et al ., 2016 ; Marcus et al., 1983]. A l'époque, les seules mutations connues pour l'ARVC étaient liées à la maladie de Naxos portées sur le gène codant pour la Plakoglobine [Coonar et al ., 1998 ; Castelletti et al., 2017]. En 1998, deux mutations (p.T1620M et p.R1232W) sur le gène *SCN5A* ont été identifiées dans des cas de fibrillations ventriculaires idiopathiques associées à une élévation du segment ST et un bloc de branche droite. Les deux mutations provoquent un décalage de la courbe d'inactivation du courant sodique I_{Na} vers des potentiels plus positifs et une levée d'inactivation plus rapide. Ces deux mutations, à transmission autosomique dominante, provoquent une perte de fonction de 50% des canaux sodiques cardiaques. L'expression jointe des canaux sains et mutés cause des phénomènes de réentrées qui expliquent les troubles du rythme observés chez les patients atteints des deux familles étudiées. Aucune perturbation structurale ou contractile n'a pu être identifiée chez les patients porteurs [Chen *et al.*, 1998].

L'identification de ces mutations a marqué la différence avec l'ARVC et a établi le syndrome de Brugada comme une pathologie exclusivement arythmogène avec une signature génétique propre. Entre 1998 et 2010, un nombre très important d'articles et de cas ont été liés au syndrome de Brugada, ainsi que beaucoup de questionnement sur les mécanismes physiopathologiques responsables. Des rapports de défauts de la structure cardiaque chez des

cas de Brugada ont aussi été relevés ainsi que plus de 300 mutations sur 23 nouveaux gènes (Table 2).

2.2.2. Aspects cliniques

Le syndrome de Brugada est une pathologie héréditaire responsable de l'apparition de troubles du rythme ventriculaires pouvant conduire à la mort subite de l'individu atteint. Cette maladie touche majoritairement les hommes d'un âge moyen de 40 ans et se caractérise par une signature ECG particulière : une sus-élévation du segment ST sur les dérivations précordiales droites (V1 et V2) (figure 3). A ce jour, 3 types de tracé ECG ont été rencontrés chez les patients atteints par la maladie :

- Le Brugada de type 1 : cette morphologie de tracé ECG est la plus connue et la plus répandue parmi les cas recensés, elle se distingue par un segment ST en forme de dôme ou d'onde convexe orientée vers le haut de 2 mm de décalage par rapport à la ligne isoélectrique de l'ECG. Le point culminant de cette onde est appelé « point J » et associe une inversion de l'onde T.
- Le Brugada de type 2 : ici le sus-décalage du segment ST change de morphologie et se présente comme une onde concave appelée « selle de cheval ».
- Le Brugada de type 3 : présente le même tracé ECG que le type 2, à l'exception de la partie terminale du segment ST qui est décalée d'un peu moins de 1 mm par rapport à la ligne isoélectrique.

Néanmoins, le diagnostic du syndrome de Brugada s'établit lorsque le tracé de type 1 est rencontré, soit au cours d'un ECG de base soit après l'administration d'un inhibiteur sodique.

Les autres signes cliniques sont très variables et peuvent se manifester sous l'allure d'un malaise vagal chez un sujet sans antécédents d'autant que ces manifestations surviennent au repos. L'absence de cardiopathie sous-jacente est l'un des critères déterminants du diagnostic qui est déjà complexe à mener sur un phénotype labile. Certains patients sont diagnostiqués grâce à un ECG systématique ou lors d'un dépistage familial après l'identification d'un membre de la famille atteint du syndrome [atarshi et al., 1996].

Il est important de noter que l'apparition de ces évènements arythmiques fluctue dans le temps et dépend du système nerveux autonome ainsi que de paramètres environnementaux tels que l'activité physique, la prise de médicaments et la température corporelle de l'individu atteint [Miyazaki et al., 1996 ; Rattanawong et al., 2016]. L'effort physique et les béta-stimulants ont tendance à diminuer la fréquence d'apparition de ces évènements alors que l'hyperthermie, la stimulation vagale et les inhibiteurs du courant sodique (Ajmaline, Flecaïnide) tendent à les majorer [Brugada et al., 2000 ; Priori et al., 2000 ; Talib et al., 2016 ; Subramanian et al ., 2017].

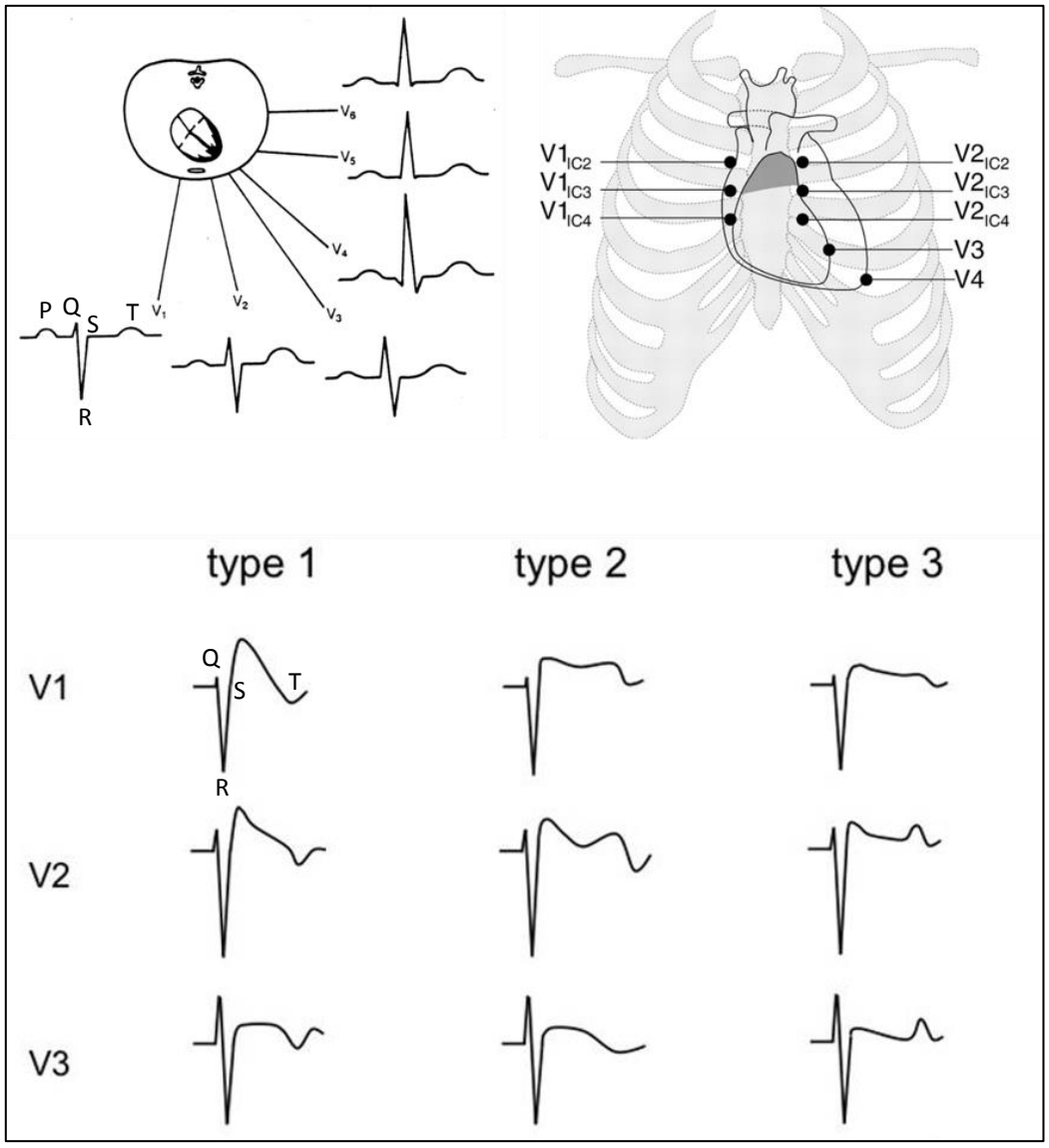


Figure 3 : Signature ECG du syndrome de Brugada

Position des dérivations précordiales autour de la face droite du cœur et exemples des 3 tracés ECG caractéristiques du syndrome de Brugada.

2.2.3. Aspects génétiques

C'est une pathologie à transmission autosomique dominante avec une pénétrance incomplète et de nombreux cas de phénocopies au sein de familles dont plusieurs membres portent la même mutation génétique causant le syndrome de Brugada. Ces individus présentent le tableau clinique caractéristique du syndrome mais ne portent pas la mutation identifiée chez les autres membres atteints. Plus de 20% des cas atteints du syndrome de Brugada ont été liés à des mutations portées sur le gène *SCN5A* qui est considéré comme un acteur central de la pathologie [Juang et al ., 2016]. *SCN5A* est porté par le chromosome 3p21 et comprends 28 exons codant pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque $Na_V1.5$ connu pour son rôle majeur dans l'initiation du potentiel d'action et la conduction électrique cardiaque. Même si la présence de mutations sur ce gène signe la présence de la pathologie, leur absence n'exclut pas le syndrome.

D'autres mutations ont révélé l'implication d'autres gènes tels que les gènes codant pour les sous-unités des canaux calciques de type L ou des canaux générant le courant repolarisant I_{to}. L'investigation fonctionnelle de l'impact de ces mutations sur les courants ioniques résultant de la conductance de ces canaux par la technique de patch clamp a permis de mettre en évidence une perte de fonction systématique du courant sodique et calcique et un gain de fonction du courant potassique I_{to} [Abott 2016 ; Gourraud et al ., 2016]. En somme, seulement 30% des cas atteints du syndrome de Brugada ont été associés à des mutations génétiques, ce qui laisse 70% des cas sans origine génétique déterminée.

2.2.4. Mécanismes électro physiologiques

Malgré l'intérêt majeur que suscite cette pathologie au sein de la communauté scientifique, les mécanismes physiopathologiques menant à l'apparition du syndrome de Brugada restent flous. Bien que le gène *SCN5A* semble être l'un des acteurs principaux impliqués dans les troubles du rythme observés chez les patients, le manque de pénétrance des variants identifiés et les phénocopies observées discréditent la théorie du gène candidat unique. Avec plus de 23 gènes supplémentaires impliqués et 70% de cas de Brugada non liés à des causes génétiques identifiées, il devient évident que ce syndrome est une pathologie polygénique qui se traduit en un phénotype hétérogène et complexe (tableau2) [Watanabe et al., 2016].

Tableau 2 : *Classification des gènes impliqués dans le syndrome de Brugada (d'après Sieira et al., 2016 ; Fernandez-Falgeras et al., 2017)*

Gène	*Protéine*	*Locus*	*Proportion génétique*
			Courant sodique
SCN5A	Sous-unité α du canal sodique NaV1.5	3p21	11-28 %
SCN10A	Sous-unité α du canal sodique NaV1.8	3p22.2	5-16,7 %
GPD1L	Glycerol-3-phosphate déshydrogénase 1-like protéine	3p22.3	<1 %
SCN1B	Sous-unité β 1 du canal sodique NaV1.5	19q13.12	1,1 %
SCN2B	Sous-unité β 2 du canal sodique NaV1.5	11q23.3	<1 %
SCN3B	Sous-unité β 3 du canal sodique NaV1.5	11q24.1	<1 %
RANGRF	Facteur de libération du nucléotide guanine de Ran	17p13.1	<1 %
SLMAP	Protéine associée à la membrane du sarcolemme	3p14.3	<1 %
PKP2	Plakophiline 2	12p11	<1 %
			Courant calcique
CACNA1C	Sous-unité α1c du canal calcique de type L CaV1.2	12p13.33	6,6 %
CACNB2B	Sous-unité β 2 du canal calcique de type L CaV1.2	10p12.23 p12.31	4,8 %
CACNA2D1	Sous-unité α2/δ1 du canal calcique de type L CaV1.2	7q21.11	1,8 %
TRPM4	Membre 4 de la sous famille des canaux cationiques non sélectifs	19q13.33	<1 %
			Courants potassiques
KCND3	Membre 3 de la sous-famille D des canaux potassiques voltage-dépendants	1p13.2	<1 %
KCNE3	Membre 3 de la sous-famille E des canaux potassiques voltage-dépendants	11q13.4	<1 %
KCNJ8	Canal potassique rectifiant 8 ATP-sensible entrant	12p12.1	2 %
HCN4	Canal potassique/sodique dépendant des nucléotides cycliques sensible à l'hyperpolarisation	15q24.1	<1 %
KCNE5	Sous-unité β 5 des canaux potassiques voltage-dépendants de la sous-famille E	Xq22.3	<1 %
KCND2	Membre 2 de la sous-famille D des canaux potassiques voltage-dépendants	7q31.31	<1 %
			Autres
ABCC9	Membre 9 de la sous famille des récepteurs à l'ATP	12p12.1	<1 %
FGF12	Facteur de croissance fibroblastique	3q29	<1 %
SEMA3A	Semaphorine 3	6q22.31	<1 %

Un nombre considérable d'études a essayé d'élucider la question des causes sous-jacentes menant au syndrome de Brugada. Le manque d'investigations au niveau cellulaire et l'absence d'un modèle approprié a rendu l'étude de ce syndrome plus ardu. Néanmoins, deux hypothèses ont été développées :

- L'hypothèse de la dépolarisation :

Cette hypothèse a été proposée par le groupe du Dr Arthur Wilde et ses collaborateurs qui postulent que lorsque le canal sodique Nav1.5 porte une mutation perte de fonction ou que le canal est moins exprimé à la membrane des cardiomyocytes, ce qui, dans les deux cas, mène à une diminution de la conductance membranaire du courant sodique I_{Na}. Cette réduction provoque une diminution de la conduction cardiaque à la surface de la paroi myocardique de la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT). Cette zone anatomique particulière du cœur se trouve à l'interface du tronc pulmonaire et du haut du ventricule droit et présente une hétérogénéité tissulaire qui peut aggraver ces troubles de la conduction et favoriser l'apparition de réentrées électriques de phase 2, ce qui augmente la susceptibilité d'apparition de troubles du rythme cardiaque [Sande et al., 2015].

Selon cette hypothèse, la sus-élévation du segment ST observée à l'ECG des patients atteints du syndrome de Brugada serait causée par le ralentissement de la conduction électrique au niveau du RVOT (figure 4). Ce modèle s'appuie sur les mécanismes menant à l'élévation du segment ST en cas d'ischémie transmurale où l'hétérogénéité avec la zone non ischémiée est si importante qu'elle provoque un délai dans la propagation de l'influx électrique [Margolis et al., 2017]. Des données de cartographie électrique de l'endocarde et de l'épicarde ont mis en évidence un ralentissement comparable au niveau du RVOT et l'ablation par radiofréquence des foyers qui présentaient ces ralentissements a significativement diminué la survenue de troubles du rythme chez les patients atteints du syndrome de Brugada (Nademanee et al., 2011).

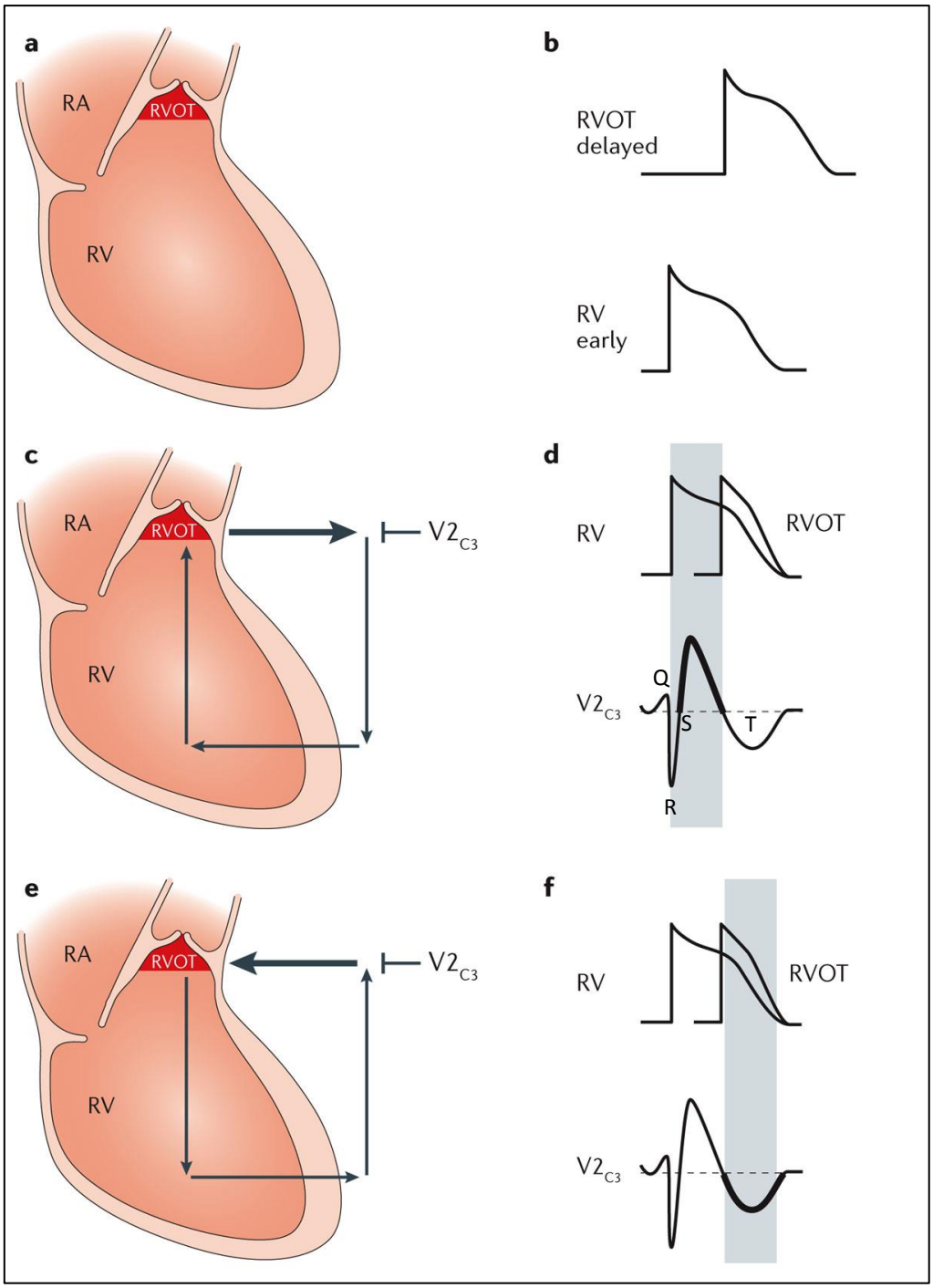


Figure 4 : ***La théorie de la dépolarisation du syndrome de Brugada****.*

Le ralentissement de la conduction électrique dans la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT) serait impliqué dans l'apparition de la sus-élévation du segment ST ainsi que des troubles du rythme. ***a.*** *Vue longitudinale du ventricule droit avec la position du RVOT.* ***b****. Le potentiel d'action du RVOT et retardé par rapport à celui de la paroi libre du ventricule droit.* ***c*** *et* ***d.*** *Le courant se propage du ventricule droit au RVOT et à travers le myocarde pendant le déroulement du segment ST au cours du cycle cardiaque.* ***e*** *et* ***f****. Une inversion du gradient de potentiel entre le ventricule droit et le RVOT. RA : atrium droit, V2c3 ; voie précordiale positionnée sur le RVOT. RA : oreillette droite ; RV : ventricule droit. Meregalli,E.G et al ., 2005.*

- L'hypothèse de la repolarisation :

Cette hypothèse, supportée par Antzelevitch et ses collaborateurs, suggère qu'une perturbation de la balance des courants hyperpolarisants dans le ventricule droit favoriserait l'apparition de réentrées de type 2. Ces évènements augmentent l'apparition d'extrasystoles qui peuvent provoquer des fibrillations ventriculaires. Selon cette théorie, la combinaison d'une réduction du courant sodique I_{Na} et d'une augmentation du courant potassique I_{to} accentuerait la phase de dépolarisation précoce du potentiel d'action déjà plus marquée dans la couche épimyocardique par rapport au potentiel d'action endomyocardique. Cette hétérogénéité créé un gradient transmural responsable de l'apparition de la sus-élévation du segment ST à l'ECG chez les patients atteints du syndrome de Brugada (figure 5).

Des travaux effectués sur la paroi libre de ventricule droit canin montrent que l'hyperpolarisation engendrée par un gain de fonction de I_{To} combiné à la diminution de la densité du courant sodique et calcique mèneraient à l'apparition d'un potentiel d'action peu ample et très court suivi d'un potentiel d'action plus ample et de durée normale dans la couche épimyocardique [Szèl and Antzelevitch., 2014]. Ce potentiel d'action retardé coïnciderait avec la phase de repolarisation endomyocardique ce qui déclenche des réentrées de type 2, une sus-élévation du segment ST et une inversion de l'onde T [Napolitano et al., 2011].

De manière intéressante, cette hypothèse présente des homologies de mécanisme avec le syndrome de repolarisation précoce (ERS). Cette pathologie présente une accentuation du gradient transmural de la repolarisation sur les deux ventricules, et l'ECG des patients atteints montre l'apparition d'une onde J juste après le complexe QRS qui pourrait avoir les mêmes mécanismes sous-jacents que la sus-élévation du segment ST chez les patients Brugada [Barajas-Martínez et al., 2012]

Par ailleurs, Patocskai et Antzelevitch ont montré en 2016 qu'une ablation des cellules épimyocardiques du ventricule droit qui présentaient les potentiels d'action les plus affectés diminuait les phénomènes de réentrées et atténuaient la sus-élévation du segment ST chez les patients atteints du syndrome de Brugada.

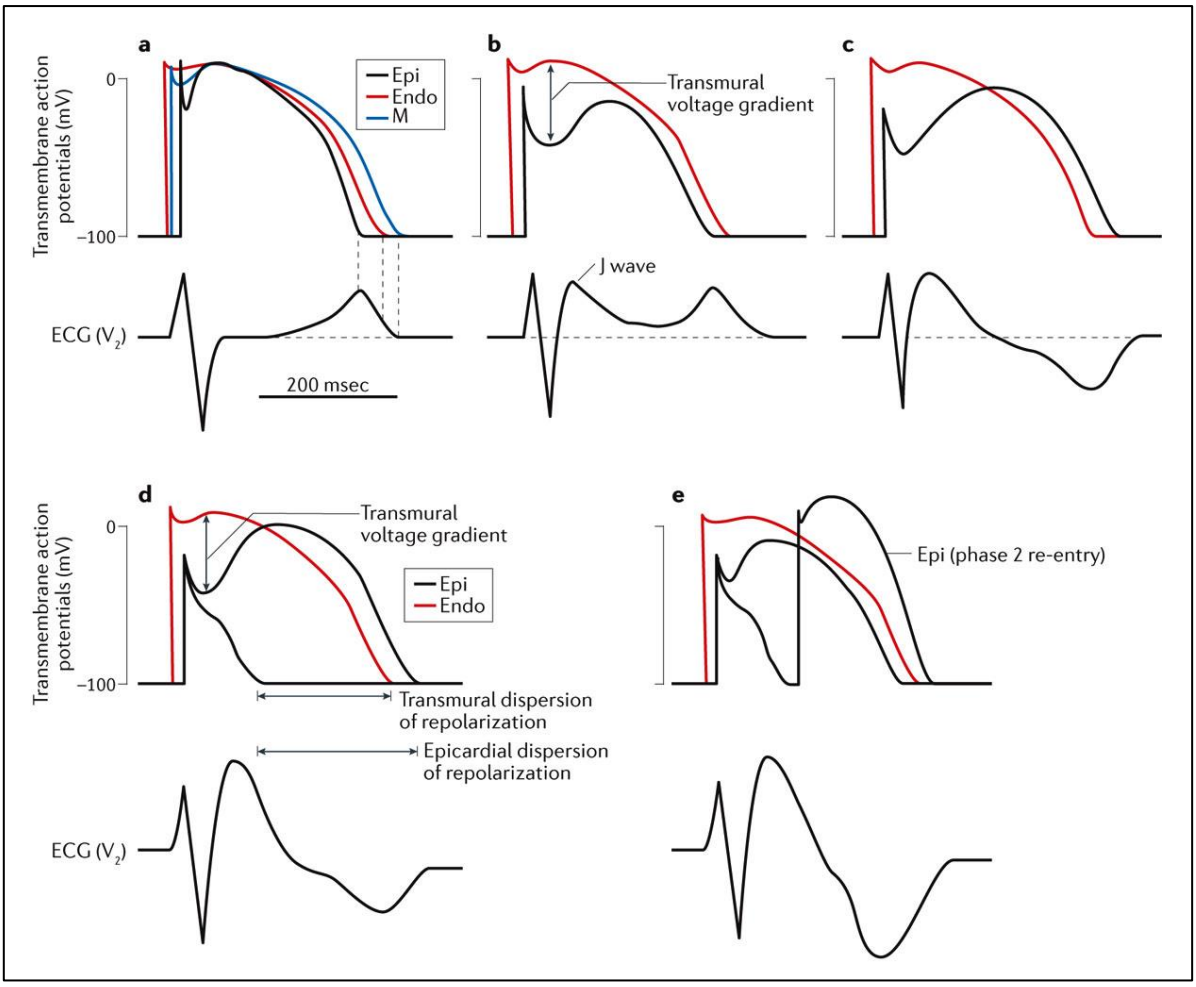


Figure 5 : l'hypothèse de la repolarisation du syndrome de Brugada.

Une combinaison entre une perte de fonction du courant sodique INa et d'un gain de fonction du coutant potassique hyperpolarisant Ito dans la couche épicardique du ventricule droit peut provoquer des anomalies de repolarisation précédemment décrits dans le syndrome de Brugada. ***a.*** *Potentiel d'action d'individus sains.* ***b.*** *Potentiel d'action d'individus atteint du syndrome d'ERS.* ***c.*** *Potentiel d'action d'individus atteints du syndrome de Brugada.* ***d.*** *Potentiels d'action Brugada avec une dispersion transmurale épicardique de la repolarisation.* ***e.*** *Potentiel d'action Brugada avec une perte de fonction de la dépolarisation dur la couche épicardique et le déclenchement de réentrée de type 2. ECG : électrocardiogramme. Endo : endomyocarde. Epi : épimyocarde. M : midmyocarde. Antzelevicth 2001.*

Ces deux hypothèses sur les mécanismes potentiels causant le syndrome de Brugada ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives et peuvent, au contraire, avoir un rôle synergique. L'une comme l'autre proposent un mécanisme pertinent pour l'élément déclencheur de réentrées électriques observées dans le syndrome de Brugada mais l'apparition de ces troubles du rythme nécessite un substrat préexistant. Une nouvelle

hypothèse a récemment vu le jour. Celle-ci ne repose pas sur l'origine électrophysiologique des troubles de la conduction observés chez les patients Brugada mais sur l'origine embryonnaire des cellules qui forment le RVOT.

2.2.5. *Mécanismes structuraux :*

- Origines embryonnaires du RVOT :

Au cours du développement cardiaque, une hétérogénéité électrophysiologique apparait entre l'apex et la base, entre le ventricule droit et le ventricule gauche, entre la paroi libre du ventricule droit et sa chambre de chasse (RVOT) et entre l'endocarde et l'épicarde [Näbauer et al., 1996 ; Boukens et al., 2016]. Ces différences électrophysiologiques sont le résultat d'une expression différentielle des gènes codants pour les canaux ioniques et les connexines responsables de la génération du potentiel d'action cardiaque [Soltysinska et al., 2009].

Plusieurs mécanismes potentiels peuvent être à l'origine de ces différences d'expression génique chez l'adulte. Par exemple, l'ischémie résultant d'un infarctus du myocarde induit un remodelage myocardique aggravant le gradient transmural dans la zone atteinte. Pour le syndrome de Brugada, l'hypothèse émise stipule que l'hétérogénéité phénotypique des cellules progénitrices à l'origine des cellules cardiaques au cours du développement persisterait chez l'adulte [Elizari et al ., 2007].

Il a été établi que l'hétérogénéité spatiale de l'expression des canaux ioniques et des connexines dans le cœur adulte dépend de la localisation de facteurs de transcription intervenant au cours du développement cardiaque [Boukens et al., 2016]. La présence de ces facteurs de transcription dépend de l'origine embryonnaire des cellules progénitrices du cœur tubulaire qui va se transformer en myocarde adulte.

Le cœur embryonnaire primitif est un simple tube avec une couche externe de cardiomyocytes, une couche interne d'endocarde et une gelée cardiaque entre les deux. Les cellules cardiaques de ce tube proviennent de progéniteurs cardiaques appelés « le premier champ cardiaque » ou FHF (*first heart field*). Ces cellules se différencient en cellules myocardiques et fusent des deux côtés du tube formant un cœur linéaire avec une entrée caudale et une sortie crâniale. La structure du tube qui forme la sortie est ce qu'on appelle communément la « chambre de chasse » [Epstein 2010].

À ce stade, le cœur se développe rapidement et fait appel à des progéniteurs cardiaques supplémentaires provenant du second champ cardiaque (SHF, pour *second heart field*) cette fois, qui vont se fixer autour de la chambre de chasse, au pôle apical du tube cardiaque primitif et sur sa face dorsale. Ces cellules progénitrices vont largement contribuer à la formation du ventricule droit, de l'atrium et de la partie droite du septum [Kelly et al., 2001]. Au cours de la phase d'élongation, le tube primitif cardiaque se tord et forme une boucle dans laquelle des cardiomyocytes fonctionnels commencent à se développer dans la face ventrale du cœur qui correspond au futur ventricule gauche. La face dorso-crâniale ne se développe qu'après et présente une conduction électrique lente et de faibles propriétés contractiles. Cette zone concentre un grand nombre de cellules progénitrices du SHF qui expriment le facteur de transcription ISLET 1, aussi associé à la différenciation de ces mêmes progéniteurs en cellules musculaires lisses participant à la vascularisation du cœur [Cai et al., 2003]. Une grande partie de ces cellules va former le future ventricule droit et RVOT et le reste formera les connections entre l'aorte et le ventricule gauche (figure 6).

Du fait de ces origines embryonnaires hétérogènes, les ventricules droit et gauche du cœur adulte présentent des différences morphologiques et fonctionnelles assez marquées. Il ne serait pas aberrant d'avancer que des programmes transcriptionnels spécifiques aux deux champs cardiaques embryonnaires d'origine soient impliqués dans ces différences phénotypiques [Lombardi et al., 2009]. Ces mêmes facteurs de transcription réguleraient les gradients transmuraux d'expression des canaux ioniques et des connexines et seraient à l'origine de la différenciation du tissu nodal [Christoffels 2010].

Les facteurs de transcription Tbox (TBX) et NKX2-5 jouent un rôle important dans le développement et la compartimentation du tissu cardiaque [Cai et al., 2008]. Le tissu conducteur auriculo-ventriculaire présente une faible expression de Cx40, Cx43 et SCN5A. TBX2 interagit directement avec le promoteur du gène codant pour la Cx43 et réprime son expression tout comme TBX2 réprime ces mêmes gènes dans le canal auriculo-ventriculaire qui est à l'origine du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire et qui confère aux cellules automatiques une conduction lente et une activité spontanée [Christoffels 2010].

De la même manière, le RVOT et le VD ayant une origine embryonnaire différente de celle du reste du cœur, portent un programme de régulation transcriptionnelle propre aux cellules du SHF. Les deux champs embryonnaires cardiaques (FHF et SHF) se distinguent par leur

expression différentielle des facteurs de transcription Hand. Le FHF exprime Hand 1, qui lorsqu'il est éteint provoque une perturbation de l'expression génique des canaux ioniques. Le SHF exprime Hand 2 dont l'absence induit une hypoplasie ventriculaire droite. Malgré le rôle synergique que jouent Hand 1 et 2 au cours du développement cardiaque, leurs activités se séparent dans le cœur adulte et gouvernent des programmes transcriptionnels distincts entre le ventricule droit et gauche [McFadden et al., 2005] (Tableau 3).

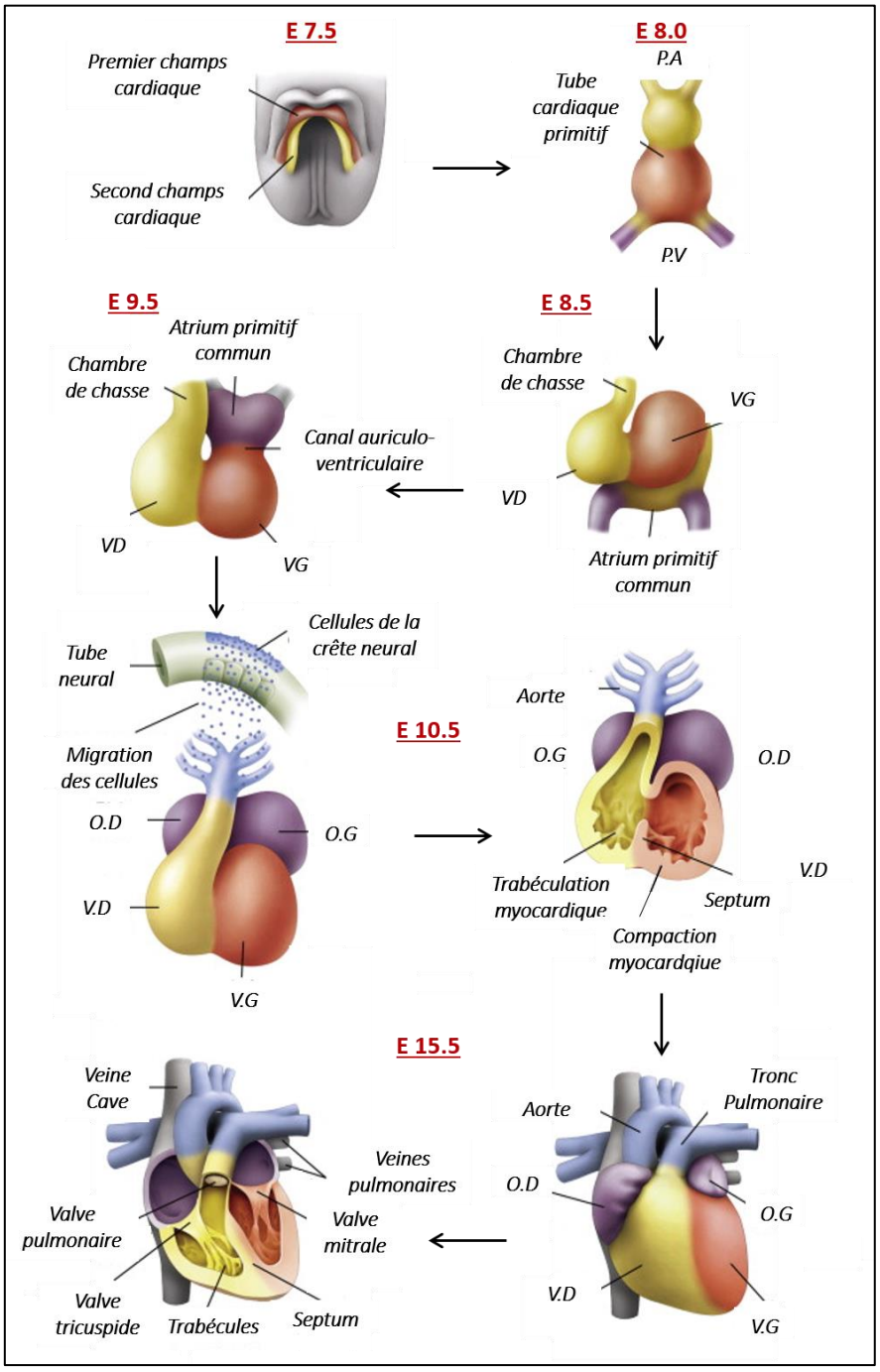


Figure 6 : Développement cardiaque

Les cellules cardiaques prennent leur origine du mésoderme. Au cours de la gastrulation, les progéniteurs cardiaques migrent depuis le mésoderme splanchnique pour former le bourgeon cardiaque. A E7.5 le bourgeon cardiaque est divisé en deux champs de lignage de cellules progénitrices (FHF, enrouge et SHF jaune). A E8, le tube primitif cardiaque est formé, la chambre de chasse est située au pôle arteriel et l'entrée du tube cardiaque est située au pôle veineux. A E8.5 les chambres cardiaques ainsi qu'un atrium primitif commun commencent à se déssiner avec les torsions du tube. A E9.5 l'atrium primitif commun a migré au dessus des ventricules et un canal auriculo-ventriculaire commence à se déssiner. E10.5 : des cellules de la crête neurale migrent vers la chambre de chasse du cœur et le cœur continue à se développer dans une série de septations, de compactions myocardiques et de trabéculations ce qui conduit à la formation d'un cœur mature à 4 chambres avec un systême circulatoire fonctionnel à E15.5. D'après Epstein et al., 2015.

Tableau 3 : Implication des facteurs de transcription au cours du développement cardiaque et la compartimentation du cœur (selon la revue de Boukens et al., 2009).

Axe chez l'adulte	*Processus de développement*	*Facteurs de transcription impliqués*
Apex - Base	Les myocytes de la base se différencient plus tard que les cellules de l'apex, et ce à cause de leur exposition plus prolongée aux facteurs de transcription inhibiteurs de la différenciation que contiennent les cellules issues du second champ cardiaque	BMP2, TBX2, NKX2.5, HEY1, HEY2, SPA4/HF-1B
VD-VG	Le ventricule gauche provient des cellules progénitrices cardiaques du FHF (premier champ cardiaque) et le ventricule droit se différencie à partir des cellules du SHF (second champs cardiaque).	ISL1,HAND1,HAND 2, TBX1, FGF8, FGF10, FOXH1, NOTCH, NKX2.5, MEF2C
VD-RVOT	Le RVOT se différencie le plus tard et le plus lentement, il provient de la chambre de chasse du tube cardiaque primitif et se caractérise par une conduction plus lente que celle du VD	TBX2, TBX3, TBX5
Epicarde-Endocarde	Morphologiquement, l'endomyocarde tapisse la lumière du cœur et initie la trabéculation, son potentiel d'action a une dépolarisation moins rapide et une durée plus longue que le potentiel d'action épicardique. L'épimyocarde forme une couche de cardiomyocytes compacte et homogène à la surface du cœur.	IRX3, IRX5, HEY2, FGF4, FGF9, FGF16, FGF20, FGF29, Endothéline, Neureguline, Ac. rétinoïque, NOTCH.

Parmi les protéines régulées par ces programmes, la connexine 43 joue un rôle clé dans la migration et l'intégration des cellules de la crête neurale au cours du développement cardiaque [Elizari et al ., 2007]. Les variations d'expression de cette protéine impactent directement la vitesse de migration et le nombre de cellules participant à la formation du VD et du RVOT [Waldo et al., 1999]. L'expression de la connexine 43 détermine aussi l'efficacité de la conduction électrique dépendant de la formation des jonctions *Gap* dans ces mêmes

compartiments, une perturbation de ce degré d'expression pourrait expliquer les troubles du rythme observés dans ces zones chez les patients atteints du syndrome de Brugada.

- Le Connexome :

La Cx43 fait partie d'un complexe macromoléculaire situé au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes. Ce complexe comprend 3 groupes de protéines, chacun impliqué dans une fonction précise :

1) Les jonctions adhérentes qui forment la « *facia adherens* » sont principalement constituées de N-Cadhérines et assurent la jonction entre le cytosquelette d'actine des cellules adjacentes et le maintien mécanique des disques au cours de la contraction des cardiomyocytes grâce à des protéines telles que la Vinculine qui fait partie du complexe de points focaux d'adhésion.
2) Les desmosomes ou « *macula adherens* » sont composés de Desmogléine de Placophilline et apportent un support structural aux tissus cardiaques. Ce sont des structures robustes et symétriques dont les propriétés adhésives dépendent de la concentration de calcium intracellulaire.
3) Les jonctions Gap qui sont organisées en plaques de canaux permettant d'assurer un couplage electro-metabolique entre 2 cardiomyocytes adjacents. Chaque jonction est constituée de 2 connexons appartenant aux deux membranes opposées de cardiomyocytes adjacents et chaque connexon compte 6 molécules de connexine (figure 7).

La Cx43 reste l'isoforme majoritaire au niveau ventriculaire. Outre son rôle dans les disques intercalaires, cette protéine est impliquée dans des voies non canoniques telles que la régulation des canaux ioniques $Na_V1.5$, le métabolisme mitochondrial et la migration des cellules de la crête neurale au cours du développement [Vermij et al., 2017].

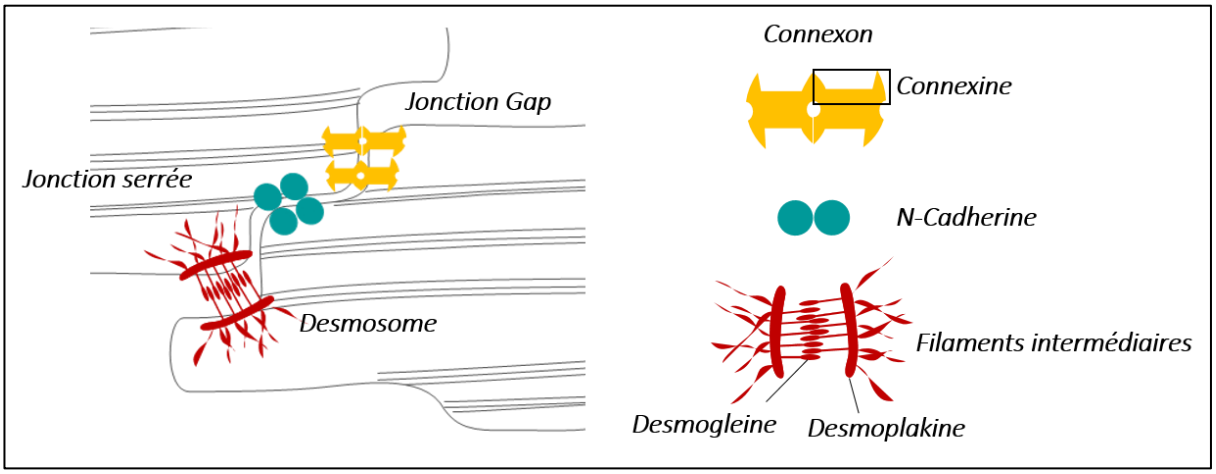


***Figure 7* : Le connexome des disques intercalaires du tissu cardiaque.**
Desmosome, jonction adhérente et jonction Gap forment un complexe macromoléculaire qui unit des protéines appartenant aux deux membranes opposées de deux cardiomyocytes adjacents.

Bien que la migration des cellules de la crête neurale dépende de l'expression de la Cx43, son activation est initiée grâce à la voie des Sémaphorines [Epstein et al., 2015]. Cette voie est essentiellement constituée de glycoprotéines secrétées ou membranaires qui agissent par voie paracrine, juxtacrine ou autocrine pour moduler le comportement cellulaire et sont réparties en huit classes. Les classes 1-2 sont retrouvées chez les invertébrés, les classes 3-7 chez les vertébrés et la classe 8 est codée par les virus. Leur fonction primaire est de réguler le comportement cellulaire et la prise de décision au cours du développement du système nerveux central, de l'activation lymphocytaire, du développement tumoral et de la motilité de l'endothélium vasculaire [Kruger et al., 2005]. Deux familles de Sémaphorines ont été identifiées et reliées au développement cardiaque : les plexines et les neuropilines principalement impliqués dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

L'un des évènements essentiels du développement cardiaque est la maturation des chambres qui se fait par la compaction des parois ventriculaires et la trabéculation de l'endocarde. Toyofuku et ses collaborateurs ont montré que l'interaction entre Sema6d (Semaphorine 6) et Plxna1 (Plexine 1) est requise pour la compaction ventriculaire. Or, Sema6d est exprimé dans le myocarde épicardique compact en gradient décroissant vers le myocarde trabéculé alors que Plxna1 présente une distribution en gradient inverse de l'endocarde vers l'épicarde [Toyofuku et al., 2004a, 2004b].

- L'hypothèse de la crête neurale :

Cette hypothèse s'intéresse à la différence des origines embryonnaires du RVOT et de ses zones voisines. Les spécificités embryonnaires, structurales et fonctionnelles du RVOT en font un candidat idéal au vu de sa localisation pour expliquer les évènements arythmiques subits par les patients atteints du syndrome de Brugada. De plus, cette hypothèse pourrait même inclure et expliquer l'hypothèse de la dépolarisation qui se base sur une hétérogénéité anatomo-fonctionnelle au niveau du RVOT qui peut aussi s'expliquer par ses origines embryonnaires différentes. Des études récentes ont décrit l'implication de variants génétiques associés au syndrome de Brugada portés sur des protéines du connexome et des Semaphorines. Une étude du groupe de Nerbonne a montré les effets d'une régulation anormale de Sema3a muté sur les canaux Kv4.3 qui conduit à l'apparition d'une sus-élévation du segment ST chez les patients porteurs de ces mutations [Boczek et al., 2014]. De la même façon, une étude a montré que la co-expression d'une Vinculine mutée avec une mutation SCN5A associée au syndrome de Brugada favorisait l'apparition des troubles du rythme [Cheg et al., 2017a, 2017b]. D'autres études se sont intéressées à des variants identifiés sur les sous-unités β des canaux sodiques menant à des cardiomyopathies ou au développement d'une ARVC [Molina-Navarro et al., 2013 ; Refsgaard et al., 2012]. Ceci remet au premier plan le rôle que jouent ces sous-unités dans la stabilisation des points focaux d'adhésion et le canal Nav1.5 au niveau du sarcolemme et du connexome dans les disques intercalaires et donc l'impact des variants reliés au syndrome de Brugada sur ces mêmes acteurs.

A ce jour, aucune étude clinique ou expérimentale n'a apporté la preuve irréfutable de l'implication d'une hypothèse en excluant les deux autres. Le large spectre des atteintes rythmiques des patients atteints de ce syndrome et la complexité de son champ génétique semblent révéler une association de mécanismes sous-jacents et non une voie linéaire et unique. Il est aussi important de souligner que les éléments mis en évidence récemment sur la dimension structurale de la pathologie remettent en question la définition initiale du syndrome de Brugada qui a été décrit comme un trouble exclusivement électrique. Il semblerait qu'en plus des dysfonctions de canaux ioniques, il faille considérer l'impact de ces dysfonctions sur l'adhésion, la migration et l'agrégation cellulaire au cours du développement et à l'âge adulte. De la même façon, ces données mettent l'accent sur la nécessité investiguer

les protéines impliquées dans ces fonctions comme des gènes candidats précédemment associés à l'apparition des troubles du rythme.

3. La protéine Rad GTPase

3.1. Les protéines G :

Les protéines G (guanine nucleotide binding proteins) se définissent par leur capacité de fixer et d'hydrolyser le GTP en GDP. Leur constitution peptidique particulière leur permet de former un domaine appelé « G » qui oscille entre deux états conformationnels qui lui permet d'interagir avec le GTP ou le GDP selon son statut d'activation. Lorsqu'elles sont activées, ces protéines hydrolysent le GTP ce qui leur confère aussi le nom de GTPases ; après cette hydrolyse, la GTPase est couplée au GDP et reste inactivée jusqu'au moment où un partenaire va lui permettre de se coupler à nouveau au GTP. Ce cycle catalytique peut s'accomplir en présence ou en absence de facteurs d'échange (GEF) ou d'inhibiteurs d'échange (GDI) selon le type de protéine G. Trois classes de protéines G ont été déterminées depuis leur découverte dans les années 60 : Les protéines G hétérotrimériques qui sont généralement couplées aux récepteurs à sept domaines transmembranaires, les facteurs d'élongation qui interviennent dans la biosynthèse des protéines et les petites protéines G monomériques.

3.2. Les protéines G monomériques :

La première protéine G monomérique a été mise en évidence par Scolnick et ses collaborateurs lors de ses travaux en virologie sur des lignées cancéreuses de rats. Ces travaux ont permis d'identifier une petite protéine de 21 kDa codée par un gène viral nommé RAS (RAt Sarcolemmal virus) et que ces auteurs ont nommé P21. La même équipe caractérisera ses propriétés biochimiques et mettra en évidence sa capacité à hydrolyser le GTP. La même année, Langbeheim et ses collaborateurs identifient ce même gène dans des lignées mammifères non cancéreuses. P21 a été la première d'une vaste famille de protéines G monomériques appelée la superfamille des Ras, qui compte plus de 166 membres à ce jour [Scolnick et al., 1979 ; Scolnick et al., 1980 ; Langbeheim et al., 1980].

Leurs fonctions se déclinent dans différents aspects de la transduction de signaux cellulaires et modulent la réponse de la cellule à un stimulus extracellulaire qu'il soit mécanique, chimique ou électrique. Sur la base d'une homologie de structure et de fonction, la superfamille Ras se scinde en 5 familles de protéines G monomériques : Ras, Rho, Rab, Arf

et Ran (figure 8). Les différences d'homologie retrouvées entre les membres de ces familles se localisent majoritairement au niveau du domaine G qui présente seulement 30% de similitudes entre les 5 familles. Ces différences sont la clé de la diversité des fonctions accomplies par ces protéines.

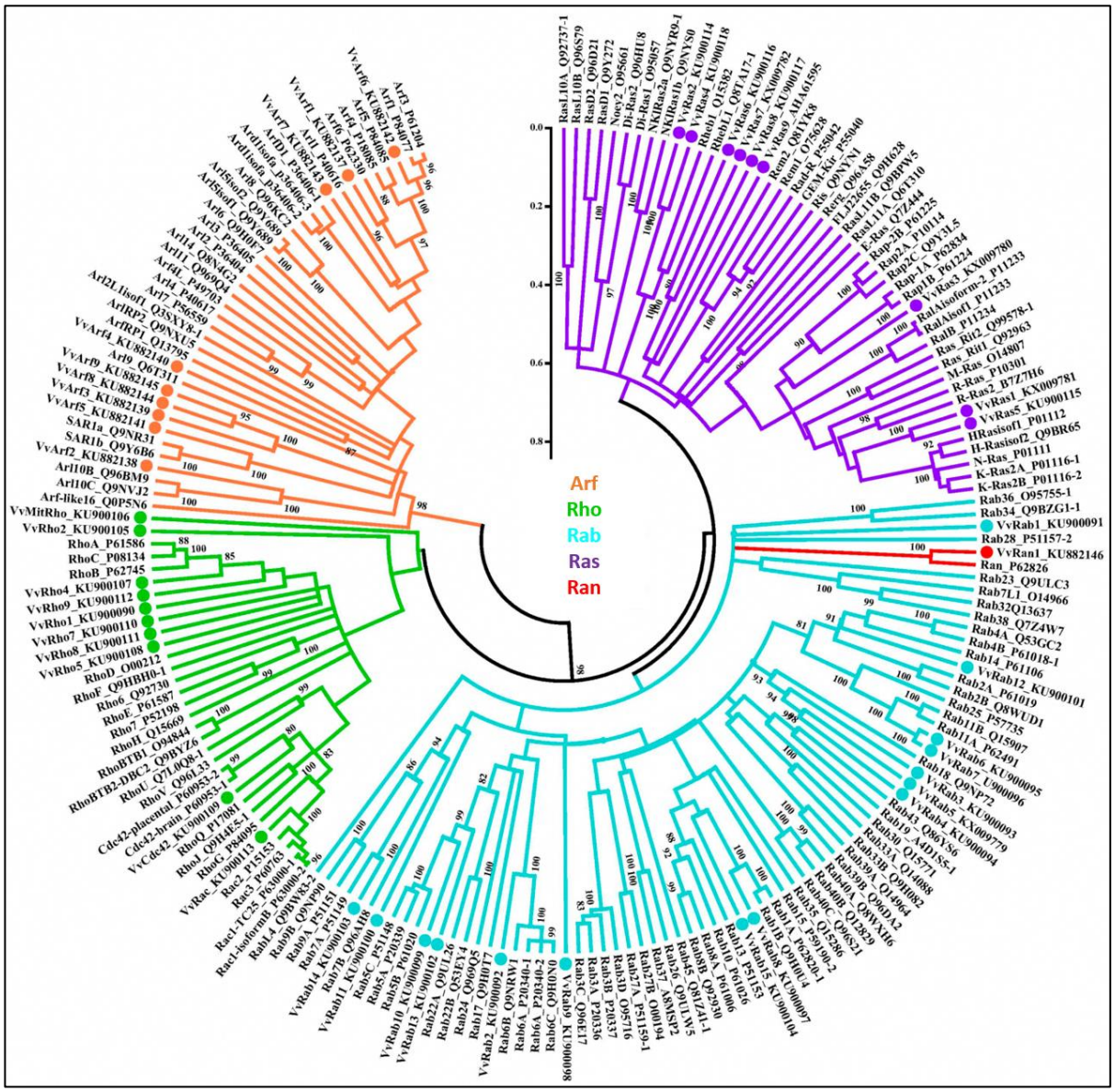


Figure 8 : La superfamille des protéines G monomériques RAS.
Les cinq familles sont représentées : Arf, Rho, Rab, Ras et Ran. Yan et al., 2016.

3.3. La famille des Ras :

Les petites protéines G monomériques de la famille des Ras (20 à 35 kDa) sont connues pour leur rôle pivot dans la régulation des voies de signalisations impliquées dans les fonctions fondamentales cellulaires telles que la division, la migration, l'adhésion et la survie en modulant la plasticité cellulaire en fonction de l'environnement. Ces protéines sont exprimées par les organismes procaryotes et eucaryotes et présentent des homologies de séquences codantes très conservées entre les espèces [Ligeti et al., 2012 ; Loirand et al., 2013].

3.3.1. Structure globale :

La structure tridimensionnelle des protéines de la famille Ras consiste en un domaine central composé de 6 feuillets β entouré d'un domaine cortical constitué de 5 hélices α. Le domaine G représente la partie conservée entre tous les membres de la famille Ras et compte 166 résidus, alors que l'extrémité C-terminale comprend un domaine appelé HVR pour *HyperVariable domain* et illustre toute la diversité de fonctions observée entre les différents membres [Bourne et al., 1991].

- Les extrémités terminales :

Les protéines de la famille des Ras possèdent des extrémités N- et C-terminales plus ou moins développées selon leurs fonctions et le nombre de leurs partenaires. L'extrémité C-terminale présente un motif CAAX qui, lorsqu'il porte une modification post-traductionnelle de type Geranylgeranyl ou Farnesyl sur son résidu Cystéine, est capable de se lier à la membrane plasmique, permettant ainsi le rapprochement de la protéine G de ses effecteurs membranaires. Un système de régulation négative des protéines G monomériques consiste à empêcher la liaison de ces complexes lipidiques au motif CAAX par l'intervention d'inhibiteurs de la Farnesyltransferase (FTIs) ou de la Geranylgeranyltransferase, ce qui conduit à la perte de proximité de l'effecteur. l'extrémité N-terminale se lie au domaine G3 et participe ainsi à l'activité GTPase de la protéine [Ahearn et al., 2011 ; Itzen et al., 2011].

- Le domaine G :

Ce domaine comprend 6 boucles polypeptidiques formant les sites G1 à G5 qui relient les feuillets β aux hélices α et forment la poche d'interaction et d'hydrolyse du GTP. Ces sites contiennent des séquences consensus qui permettent la fixation les nucléotides guanyliques. Le site G1 (GXXXXGKS/T) appelé aussi boucle « P » interagit avec le GDP par son phosphate β.

La fixation du Mg^{2+} qui est essentielle à l'hydrolyse du GTP se fait en G3 alors qu'elle dépend de la phosporylation de la Thr35 sur le site G2. Le site G3 est aussi le site de fixation du GTP par son phosphate γ. Le site G4 lie le cycle de la Guanine et G5 consolide cette interaction [Pai et al., 1989]. L'échange entre les deux nucléotides phosphate dépend de changements permanents de conformation sur deux régions appelées Switch 1 et Switch 2. Cet échange peut être effectué par la GTPase de manière intrinsèque mais prend généralement quelques heures ; cette lenteur assure un contrôle des voies de signalisation régulées par ces protéines. ceci explique la présence dans ces voies de signalisation de protéines régulatrices qui permettent l'activation et l'inhibition rapide de l'activité GTPase des protéines G monomérique.

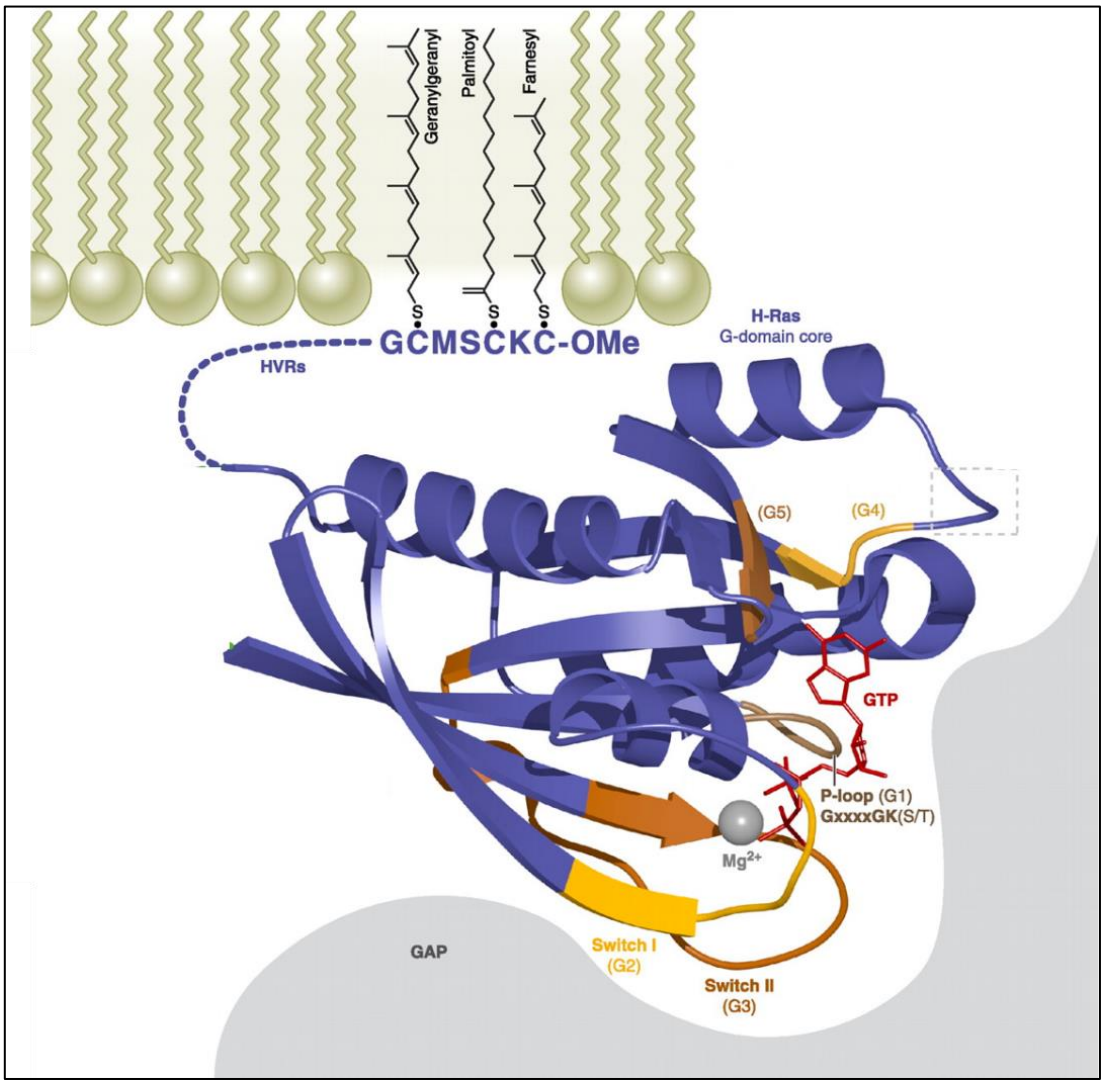


Figure 9: Structure tridimensionnelle de la protéine G monomérique de la famille des Ras.

Le domaine G avec les séquences G1 à G5 en jaune pour Switch I et orange pour Switch II. HVR : high Variable Region, contient le motif CAAX (GCMSCKC-OMe) qui permet la fixation des groupements Geranylgeranyl et Farnesyl. GAP : GTPase Activating Protein. Ligeti et al., 2012. [Rojas et al., 2012].

3.3.2. Les protéines régulatrices de l'activité GTPase :

Chaque membre de la famille des Ras est régulé par des protéines dédiées à moduler son cycle d'hydrolyse du GTP et la fréquence à laquelle ce cycle s'effectue. Les GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*) sont des inhibiteurs de l'activité GTPase des protéines Ras. Leur rôle est de maintenir l'interaction de la protéine G avec le GDP, ce qui la maintient inactive. Les GEF (*Guanine Exchange Factor*) sont des facteurs qui facilitent l'échange entre le GDP et le GTP et facilitent l'activation des protéines G monomériques. Les GAP (*Guanine Activation Protein)* accélèrent de manière significative la vitesse du cycle d'hydrolyse du GTP au sein du domaine G. Du fait de leur rôle clé dans les cascades de signalisations cellulaires, les GAP sont régulées par différents mécanismes pour mieux contrôler l'activation des protéines G : encombrement stérique, phosphorylation et dégradation par le protéasome [Loirand et al., 2008 ; Bishop et Hall ., 2000].

En somme, les protéines G monomériques de la famille des Ras sont soumises à une régulation fine et précise, permettant de contrôler leur localisation subcellulaire en modulant leur capacité de s'ancrer à la membrane plasmique, leur activité GTPase et la fréquence à laquelle ce cycle peut s'effectuer ainsi que leur expression/dégradation (figure 10).

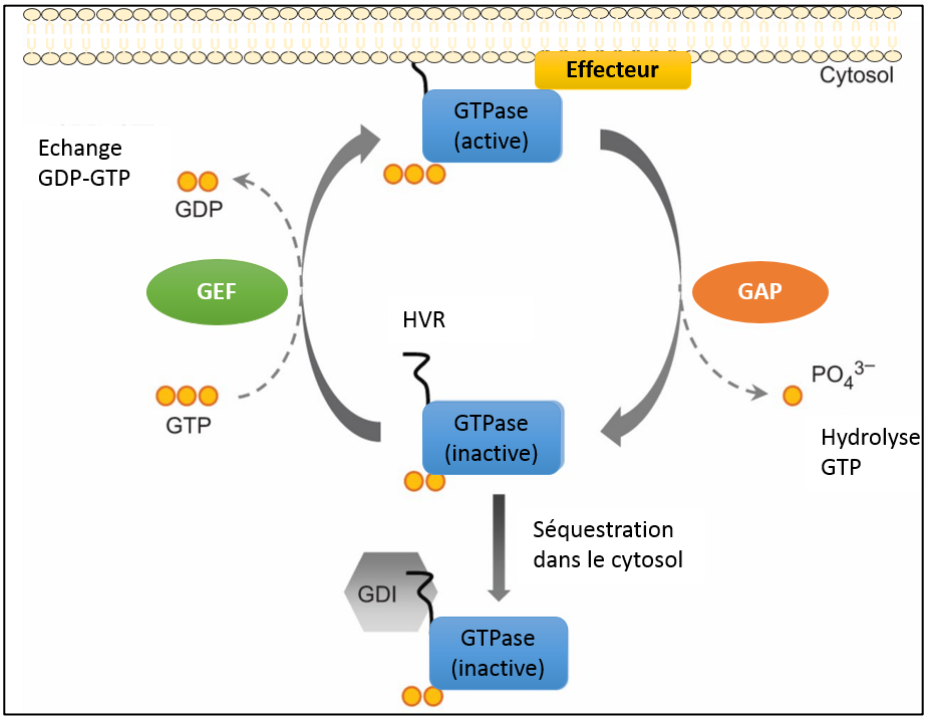


Figure 10 : Régulation du cycle d'hydrolyse du GTP par les GTPases.

3.4. La sous-famille des RGK

La sous-famille des RGK est constituée de 4 membres : Rem [Finlin et al., 1997], Gem/Kir [Cohen et al., 1994], Rem2 [Finlin et al., 2000] et Rad [Reynet and Kahn., 1993]. Ce groupe se démarque des autres sous-familles des protéines G monomériques de la grande famille des Ras par des particularités de fonction et de structure. Leur taille est un peu plus importante que celle des protéines Ras classiques. Comprise entre 30 et 40 kDa, leur séquence peptidique comprend des extrémités C et N-terminales anormalement étendues par rapport aux autres protéines de la famille Ras et qui portent des sites d'interaction avec de multiples partenaires ainsi que des sites de phosphorylation. La seconde particularité de cette famille réside dans l'absence de boite CAAX, motif de prénylation permettant la fixation des groupements Geranylgeranyl ou Farnesyl. Ces derniers sont essentiels à l'encrage des protéines G monomériques à la membrane plasmique à proximité de leurs effecteurs. Ceci les confine à une activité limitée au cytosol mais aussi dans le noyau, localisation modulée par 14-3-3 et la calmoduline (Puhl et al., 2014). La structure peptidique tridimensionnelle des RGK reste très similaire à celle des autres protéines G avec un domaine G constitué des deux séquences Switch 1 et 2.

La régulation de leur cycle d'hydrolyse du GTP reste, néanmoins, à élucider car l'absence de deux sites consensus importants en G2 (T35) et en G3 (DXXG60) pour l'hydrolyse du GTP laisse supposer que l'activité GTPase intrinsèque des RGK n'est pas très élevée. Cette supposition a été confirmée par les travaux de Finlin et ses collaborateurs qui ont mesuré l'activité GTPase de Rad *in vitro* [Zhu al., 1995]. Ces résultats peuvent aussi suggérer que Rad interagit avec le GTP de façon constitutive et qu'un mécanisme de régulation encore non caractérisé consisterait à le découpler du GTP pour l'inactiver sans passer par l'hydrolyse.

À ce jour, aucune GEF ou GDI n'a été identifiée comme étant impliquée dans la régulation des protéines RGK. La seule GAP identifiée comme pouvant être associée à la protéine Rad est une molécule synthétique développée comme un agent anti-cancéreux : le NM23. Le NM23 agit en complexe avec Rad pour augmenter son activité GTPase, accentuant considérablement son effet inhibiteur sur la croissance tumorale (Tseng et al., 2001). De la même façon, la calmoduline a été proposée comme un inhibiteur du cycle GTPase de Gem [Fischer et al., 1996]. Le seul mode de régulation identifié pour la famille des RGK est une régulation transcriptionnelle et traducttionnelle de leur expression. Étant donné la faiblesse de l'activité

GTPase de ces protéines sans GEF ni GAP identifiées, il semblerait que leur rôle consiste principalement à interagir physiquement avec leur cible dans le but d'effectuer un encombrement stérique ou à les transporter dans d'autres compartiments intracellulaires.

Les membres de la famille des RGK présentent une homologie fonctionnelle et structurale très conservée, mais leur degré d'expression change en fonction du type cellulaire et de l'organe (Table 4).

Tableau 4 : Expression tissulaire et rôle des membres de la famille des protéines RGK

Protéines	*Tissu*	*Rôle*	*Ref*
Rad	Cellules musculaires (squelettiques, lisses et cardiaques)	Régulation des canaux calciques de type L en séquestrant la sous-unité β régulatrice. Modulation de l'homéostasie calcique cardiaque par la PKA, la calmoduline et la CamKII. Régulation négative de l'adressage de GLUT4 dans le muscle squelettique des patients atteints de diabète de type 2. Interférence dans la voie Rho/RhoKinase dans les vaisseaux.	Reynet et Kahn, 1993 Yamakawa et al., 2014 Moyers et al., 1996 Ward et al., 2002
	Cellules cancéreuses	Régulation de la migration et de la progression tumorale	Tseng et al., 2001
Gem	Cerveau	Régulation de la plasticité dendritique neuronale	Krey et al., 2013
	Rein	Augmentation de son expression après transplantation rénale	Stern et al., 2008
	Foie	Régulateur négatif de la progression tumorale du carcinome hépatique	Huang et al., 2014
	Poumon	Modulateur d'expression de différents marqueurs du cancer du poumon	Finlin et al., 1997
Rem	Cellules cardiaques	Régulation des canaux calciques de type L en interagissant avec sa sous-unité β régulatrice	Chang *et al*., 2015
Rem 2	Cerveau	Régulation des canaux calciques de type N en interagissant avec sa sous-unité β Régulation de l'élongation dendritique des cellules neuronales	Finlin *et al*., 2000 Flynn *et al*., 2008

Cette description de la localisation des protéines RGK et de leur rôle se limite aux organes dans lesquels on retrouve une expression abondante. Toutefois, comme toutes les protéines G monomériques, l'expression des RGK est très labile et dépend de l'état physiologique de l'organe. Par exemple, Gem est surexprimée dans les cellules β pancréatiques après stimulation par administration de glucose [Gunton et al., 2012]. Dans les cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B), Gem augmente après stimulation mitogénique, et cette augmentation d'expression a été corrélée négativement avec l'invasivité des cellules cancéreuses métastatiques dans un modèle de neuroblastome [Leone et al., 2001].

3.5. La protéine G monomérique Rad :

Rad est le premier membre de la famille des RGK à avoir été mis en évidence par Reynet et Kahn en 1993. La protéine et son ARNm ont été retrouvés en abondance dans des extraits de muscles squelettiques prélevés sur des patients atteints de diabète de type II. Son nom vient d'ailleurs de son implication dans le diabète (Ras protein Associated with Diabetes). La protéine a été caractérisée par le même laboratoire un an plus tard et cristallisée en 2005 par Yanuar et ses collaborateurs [Reynet et al., 1993 ; Zhu et al., 1995 ; Yanuar et al., 2006].

Son domaine G est similaire à celui des autres membres de la famille avec quelques différences d'acides aminés sur les sites de fixation du GTP/GDP (Switches 1 et 2), ce qui laisse supposer que son activité GTPase peut être différente. En effet, Yanuar et ses collaborateurs, après avoir cristallisé la protéine et constaté ces différences, ont prédit que l'activité GTPase de la protéine endogène serait faible et que son interaction avec le magnésium serait plus critique à cette activité que pour les autres GTPases. Ses extrémités étendues lui permettent d'avoir un nombre considérable de partenaires protéiques et portent des sites de phosphorylation ciblées par plusieurs kinases exprimées dans le cœur.

3.5.1. Les protéines partenaires de Rad :

- Sous-unités β des canaux Ca^{2+} ($Ca_V\beta$)

Les sous-unités β des canaux calciques de type L régule leur adressage et leur stabilité au niveau du sarcolemme. Quatre isoformes ont été caractérisées dans le cœur et leurs rôles respectifs restent peu connus notamment à cause de leur grande homologie de structure et de fonction [Buraei et al., 2015]. Rad interagit physiquement avec Cavβ3 et empêche son interaction avec la sous-unité α du canal calcique de type L. Les RGK se lient aux sous-unités β

sur leur domaine NK (Nucléotide Kinase) et cette interaction ne se fait que lorsque Rad est couplée au GTP. La conséquence de cette interaction est une diminution considérable du courant calcique entrant. [Béguin et al., 2006 ; Finlin et al., 2003].

- Calmoduline

La calmoduline est connue pour jouer un rôle crucial dans la régulation de l'horloge calcique au sein des cellules contractiles. Cette protéine agit comme un médiateur de la contraction cardiaque en se liant au Ca^{2+}. Moyers et ses collaborateurs ont montré que la calmoduline interagit avec Rad et Gem et que cette interaction dépend de sa propre interaction avec le Ca^{2+} [Moyers et al., 1997]. Plusieurs sites d'interaction de la calmoduline avec Rad ont été décrits dans cette étude, tous situés en région C-terminale et cette liaison se fait préférentiellement quand Rad est couplée au GDP sans perturber son activité GTPase. De façon intéressante, il semblerait que cette interaction influence la localisation subcellulaire de Rad qui est normalement distribuée au niveau du cytosquelette. Lorsque le site d'association avec la Calmoduline, le résidu 278, est déleté, Rad se retrouve dans la fraction soluble du cytosol et n'est plus liée au cytosquelette. Selon cette même étude, Rad serait présente dans un complexe liant Rad-Calmoduline-CamKII.

- 14-3-3

14-3-3 est une protéine ubiquitaire impliquée dans la modulation de la fonction de ses cibles en modifiant leur localisation subcellulaire. Du fait de l'absence d'un motif CAAX en C-terminal sur lequel se fixent des groupements de prénylation permettant aux protéines G de se fixer à la membrane, la protéine Rad régule ses effecteurs dans le cytosol et selon sa localisation subcellulaire [Bilan et al., 1998]. Rad possède des sites d'interaction avec 14-3-3 en N-terminal (S38A) et en C-terminal (S300A) et est capable de lier toutes les isoformes de 14-3-3 à condition que cette liaison se fasse avec un dimère, une molécule par site. Comme toutes les autres RGK, Rad se localise au niveau nucléaire, cytosolique et sous-membranaire en fonction de sa régulation. En présence de Calmoduline, Rad est absente du compartiment nucléaire, et une surexpression de 14-3-3 inhibe sa translocation dans ce même compartiment. Béguin est ses collaborateurs suggèrent que 14-3-3 ne peut se lier à Rad si elle interagit déjà avec la calmoduline par modification de son affinité avec 14-3-3 ou encombrement de son site d'interaction [Béguin et al.,2006]. De manière intéressante, cette

étude rapporte que la liaison de Rad avec Cavβ3 dépend de son interaction avec la Calmoduline : lorsque ce site d'interaction est muté, la densité du courant calcique est restaurée. Par ailleurs, quand c'est le site d'interaction avec 14-3-3 qui est muté, la densité du courant calcique diminue. Ces résultats suggèrent que la calmoduline maintient Rad dans le compartiment sous-membranaire afin d'optimiser sa régulation du courant calcique de type L. La protéine 14-3-3, à l'inverse, inhibe cette régulation en séquestrant Rad dans le compartiment cytosolique lorsqu'elle n'est pas liée à la calmoduline.

- PKA :

La PKA (protéine kinase A) est une kinase AMP-cyclique dépendante qui régule différents acteurs de l'homéostasie calcique cardiaque (récepteurs, échangeurs, pompes….) en les phosphorylant. L'une de ses cibles est le récepteur à la Ryanodine de type 2 (RyR2) qui porte des sites de phosphorylation par la PKA, la PKC, la CamKII et d'autres kinases régulatrices.

Au cours de la systole, la contraction des sarcomères dépends en grande partie de la sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) via RyR2. Du fait de l'importance de son rôle dans le couplage excitation/contraction, ce récepteur est régulé par plusieurs partenaires qui modulent son ouverture et sa fermeture. La libération du calcium par RYR2 est augmentée lorsqu'il est phosphorylé sur sa Serine 2809 par la PKA. Une étude récente a montré dans un modèle de souris *Knock in* exprimant une mutation dominante négative de Rad (S105N) que l'expression de P-RyR-2809 était augmentée par rapport à la souris contrôle. La conséquence fonctionnelle de cette augmentation est l'apparition de fuites calciques du RS en diastole ce qui est considéré comme une source d'apparition de troubles du rythme cardiaque. Dans cette même étude, il a été montré que cette augmentation de la phosphorylation de RyR2 était le résultat d'une augmentation de la forme active de la PKA phosphorylée en Thr197. Une immunoprécipitation de Rad a permis de révéler une interaction directe avec la PKA ce qui laisse supposer que Rad agit comme un régulateur négatif de libération de calcium par RyR2 en empêchant l'activation de la PKA [Yamakawa et al., 2014].

- CaMKII :

En 2007, Chang et ses collaborateurs ont effectué une étude d'expression de Rad au cours du développement de l'hypertrophie cardiaque dans des échantillons humains puis sur des échantillons de rats soumis préalablement à une constriction aortique (TAC, Trans Aortic

Constriction). L'expression de Rad est diminuée dans les échantillons de cœurs humains hypertrophiés comparés aux échantillons de cœurs sains. La même diminution est observée après l'induction de la TAC sur les échantillons de rats. Dans la même étude, une mesure de l'activité de la kinase calmoduline-dépendante de type II (CaMKII) qui est connue pour son implication dans les troubles du rythme associés à l'hypertrophie cardiaque a été réalisée, et cette activité augmente en corrélation inverse avec la diminution de l'expression de Rad. Rad régule l'activité de la CaMKII en diminuant sa phosphorylation [Chang et al., 2007].

- C/EBP-δ :

Outre son implication dans la régulation de l'homéostasie calcique des cellules excitables, Rad a été liée au développement de la fibrose cardiaque en intervenant dans la voie de sécrétion du CTGF (Connective Tissue Growth Factor). Cette régulation se fait au niveau du noyau des cardiomyocytes ou Rad se lie à C/EBP-δ qui est un facteur régulant la transcription du CTGF [Zhang et al., 2011].

- P38 :

Les protéines de la famille RGK sont décrites comme des médiateurs intracellulaires de signaux externes ou internes. Au sein des cellules cardiaques, Rad semble être impliquée dans l'une des voies de signalisation apoptotiques passant par le P-38, et plus précisément par la protéine kinase dépendante du P-38 (MAPKs). Une surexpression de Rad par infection adénovirale dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés induit une augmentation du taux d'apoptose dans ces cellules. La proportion de P-38 activé et la phosphorylation de son effecteur direct ATF sont augmentées. À l'inverse, l'expression de BcL-Xl de la famille des protéines anti-apoptotique BcL-2 diminue dans ces cellules [Sun et al., 2011].

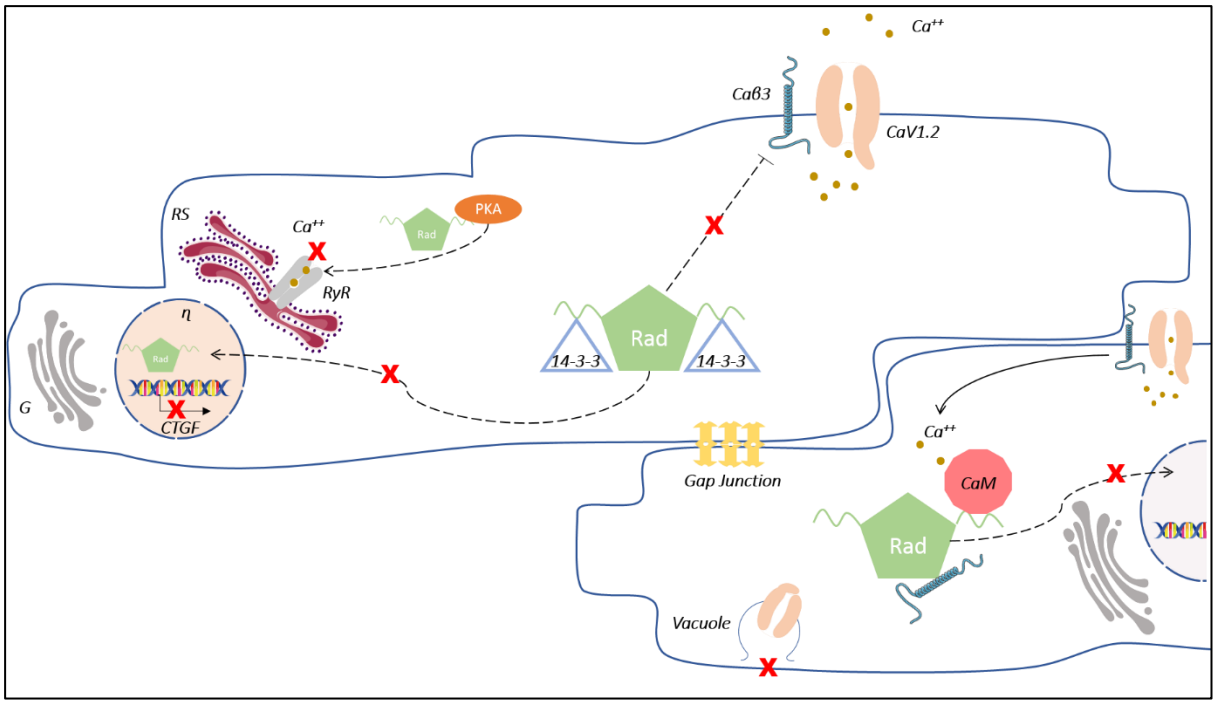


Figure 11 : Voies de signalisations impliquant Rad dans le cardiomyocyte.
Rad régule négativement le courant calcique de type L en séquestrant le sous-unité CavB3, régulation compromise quand Rad interagit avec 14-3-3 qui l'éloigne du compartiment sous-membranaire et empêche sa translocation dans le noyau. Rad régule aussi la libération du calcium du RS au cours de la diastole en empêchant la phosphorylation de RyR2 par la PKA. Dans le noyau Rad inhibe l'expression du CTGF et module ainsi le développement e la fibrose cardiaque. Quand Rad n'est pas liée à 14-3-3, la calmoduline se lie à son extrémité C-terminale et l'amène à se lier à CavB3.

Rad semble être exprimé préférentiellement au sein des cellules musculaires, qu'elles soient cardiaques, lisses ou squelettiques. Outre sa régulation des différentes voies de signalisations décrites précédemment, sa localisation subcellulaire place Rad dans le réseau du cytosquelette de ces cellules, suggérant un rôle important de Rad dans la régulation des protéines impliquées dans l'intégrité de la morphologie cellulaire et de sa fonction mécanique.

- Rho-associated protein kinases (ROCKS)

Rho Kinase joue un rôle central dans la régulation de l'architecture du cytosquelette des cellules formant les différents tissus de l'organisme. Ses fonctions principales consistent à assurer l'intégrité du cytosquelette d'actine et sa réorganisation en fonction de l'environnement de la cellule et l'assemblage des points focaux d'adhésion [Leung et al., 1995]. Deux isoformes de ROCK ont été identifiées : ROCK I également appelé ROKβ et ROCK II (alias ROKα ou encore Rho-Kinase). Ishizaki et son groupe ont été les premiers à démontrer une interaction entre ROCKII et la forme active de Rho en 1996 [Ishizaki et al., 1996]. Les

protéines ROCK partagent des homologies de fonction et de structure très proches des autres kinases responsables de la régulation des autres éléments constituant le cytosquelette telles que la DMPK (Dystrophy Myotonic Protein Kinase) et la DRCK (Kinase reliée au CDC-42). Leur domaine kinase se situe en région N-terminale et leur domaine C-terminal porte le site d'activation par Rho A. Rho A est une petite protéine G monomérique de la famille des Ras et de la sous-famille des Rho, son rôle est de contrôler les voies de signalisations régulant la plasticité, la migration et la prolifération cellulaire [Loirand et al., 2012].

En 2002, Ward et ses collaborateurs ont mis en évidence un nouveau rôle de Rad et Gem dans le contrôle de la formation des filaments d'actine et des points focaux d'adhésion dans plusieurs modèles cellulaires. Il est rapporté dans cette étude que Rad et Gem interfèrent dans la voie Rho/ROCK en interagissant physiquement avec les deux isoformes de ROCK (Rad avec ROCK II et Gem avec ROCK I) et que cette interaction avait pour effet d'inhiber l'activité de ROCK dans les deux cas indépendamment de Rho A (figure 12). Dans cette même étude, il est démontré que cette action inhibitrice sur ROCK se traduit par un effet différent sur la plasticité cellulaire en fonction du modèle. Dans les cellules N1E-115 (neuroblastomes de souris), la transfection de Rad a provoqué un aplatissement du corps cellulaire avec un allongement des neurites, alors que dans les cellules HeLa NIH-3T3 (fibroblastes), cette transfection a mené à un arrondissement cellulaire ainsi qu'à une rétraction des dendrites et un désassemblage des points focaux d'adhésion [Ward et al., 2002].

- β-Tropomyosine

Dans les fibres musculaires du muscle squelettique, rad interagit avec la β-Tropomyosine par son extrémité C-terminale (résidus 97, 107). La β-Tropomyosine est une protéine constituée de 7 hélices α formant un domaine coil-coil dont l'extrémité carboxyle est essentielle à sa liaison avec la F-actine [Butters et al., 1993]. A l'état basal, seulement une petite fraction de la protéine Rad est liée à la β-Tropomyosine, mais quand la concentration de calcium intracellulaire augmente après stimulation électrique, cette fraction augmente. De manière intéressante, l'augmentation du calcium est connue pour augmenter le couplage de Rad avec le GTP, sa forme active, alors que la β-Tropomyosine semble avoir une affinité nettement plus prononcée pour Rad lorsqu'elle est couplée au GDP [Zhu et al., 1996]. Ces observations peuvent suggérer deux hypothèses : soit Rad est inactivée par sa liaison avec la tropomyosine qui agirait comme une GAP et qui l'aiderait à hydrolyser le GTP en GDP comme cela a été

démontré pour Ras et Myr 5 [Reinhard et al., 1995], soit la tropomyosine agit comme une GDI sur Rad, la maintenant dans état inactif loin des canaux calciques en le séquestrant dans le compartiment du cytosquelette, mécanisme similaire à celui décrit pour la protéine C-Jun et la tropomyosine [Chevray et al., 1992]. Les conséquences de l'interaction de Rad-β-tropomyosine sur le cytosquelette d'actine et sur la fonction contractile des fibres musculaires restent à élucider.

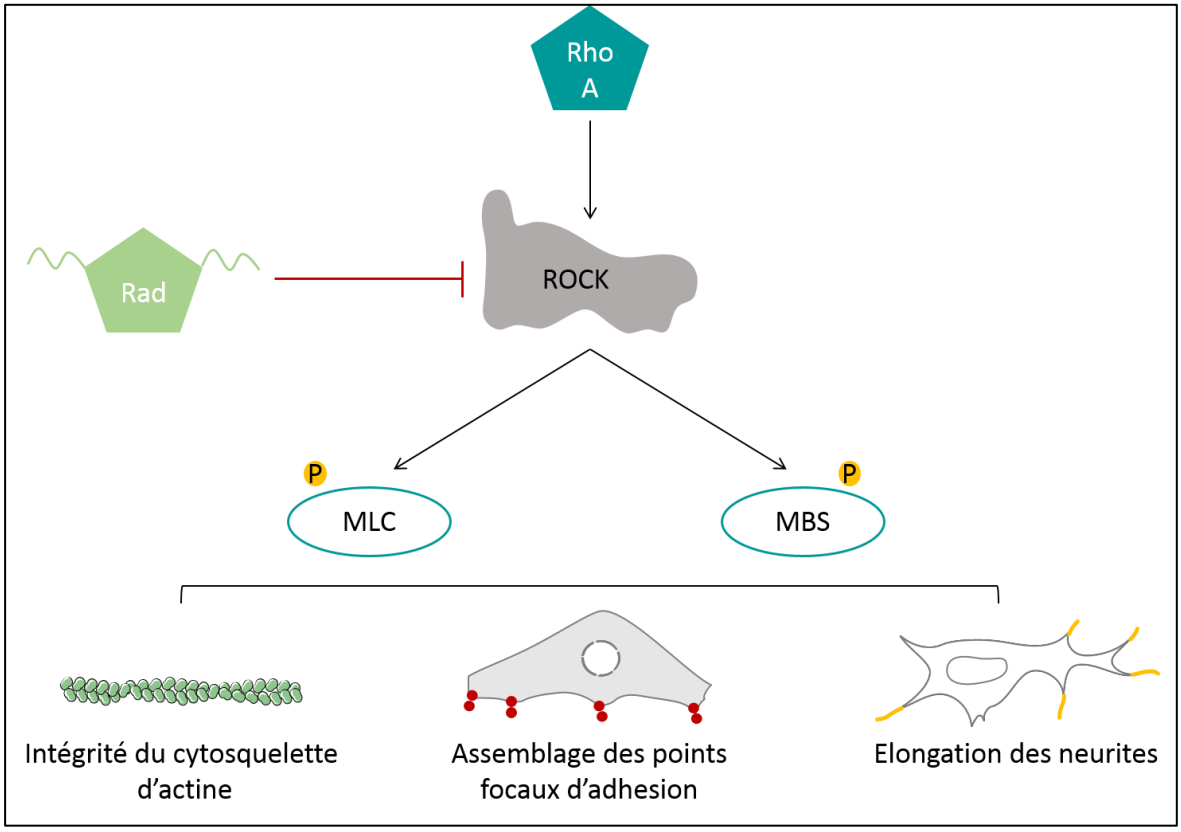


Figure 12 : Implication de Rad dans la voie de signalisation Rho/ROCK.

Rad interagit avec ROCK et inhibe sa capacité à phosphoryler les chaines légères de Myosine (MLC) et les sous-unités de la Myosine (MBS) impactant ainsi leurs différentes fonctions dans la plasticité cellulaire.

Dans un contexte physiopathologique, il a été rapporté que Rad atténuait le remodelage induit par une lésion vasculaire en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses via son interaction avec ROCK II [Fu et al., 2005]. De la même façon, cette interaction semble jouer un rôle dans l'inhibition de l'invasivité des cellules cancéreuses de tumeurs pulmonaires, hépatiques et dans le cancer du sein [Shang et al., 2015 ; Hisao et al., 2011].

Rad a été associée à d'autres partenaires mais son rôle n'a pas été établi de façon claire ou complète. Chez les patients atteints du diabète de type 2, Rad a été retrouvée en quantité importante dans le muscle squelettique et cette surexpression conduirait à une diminution

d'adressage des récepteurs au glucose GLUT4 augmentant l'insulino-résistance de ces patients [Reynet and Kahn., 1993 ; Laville et al., 1996. Moyers et al., 1996]. Dans le cancer du poumon, cette protéine régule l'activation de la voie du NF-$_k$B en modulant négativement son activité transcriptionnelle quand Rad est localisée dans le noyau. Via son interaction avec le facteur de transcription RelA/P65 , Rad agit sur l'expression de tous le effecteurs de la voie du NF-$_k$B notamment celle de MMP9 (Matrix Metallopeptidase 9) qui est impliquée dans l'invasivité des cellules cancéreuses [Hsiao et al., 2014].

3.5.2. Les sites de régulation de Rad :

- Phosphorylation

La régulation des protéines G monomériques par la phosphorylation a été rapportée pour plusieurs protéines de la famille des Ras mais le rôle de ces modifications post traductionnelles reste à déterminer. Sauf pour quelques exceptions telles que Rab4 qui change de localisation subcellulaire lorsqu'il est phosphorylé par la P34 CDC2 kinase au cours de la mitose, ou encore Rap1B qui est le substrat de la PKA dans les neutrophiles humains [Van der Sluijs et al.,1992]. Rad peut être phosphorylée par la PKA, la PKC, la CamKII et la CKII (Caseine Kinase II) sur des sites consensus portés majoritairement par son extrémité C-terminale [Reynet and Kahn ., 1993 ; Moyers et al., 1997 ; Zhu et al., 1995 ; Moyers et al., 1998]. Ces phosphorylations ont lieu sur des résidus Serine assez rapprochés les uns des autres et leur effet sur la fonction de Rad varie en fonction du site et de la kinase impliquée. Par exemple, les phosphorylations par la PKC et la CKII induisent une perte totale d'interaction avec la Calmoduline alors que des phosphorylations par la PKA (aussi partagé par la CamKII) en Ser 273 diminuent son couplage au GTP. Des mutations des sites de phosphorylation prédits pour la PKC et la CKII ont été générées, et il semblerait que le site consensus de phosphorylation par la CKII soit la Ser 214. En revanche, aucun des mutants sur les résidus Ser 214, Ser 257, Ser 273 et Ser 290 ne peut être considéré comme site consensus pour la PKC car aucun n'a pu reproduire les effets d'une délétion complète de l'extrémité C-terminale à partir du résidu 249 [Moyers et al., 1998]. Ces phosphorylations ne semblent pas affecter l'hydrolyse du GTP, mais régulent la capacité de Rad à interagir avec ses partenaires. La liaison de Rad avec 14-3-3 dépend de phosphorylations sur ces régions N- et C-terminales, alors que des phosphorylations par la PKC et la CKII empêchent son interaction avec la calmoduline (figure 13).

- Site d'ancrage

Par ailleurs, l'extrémité carboxyle de Rad porte un motif de 7 cystéines consécutives appelé C-7, parfaitement conservé parmi les membres de la famille Ras [Del Villar et al., 1996]. Selon Heo et ses collaborateurs, ce domaine servirait de point de liaison avec le PIP (Phosphatidyl Inositol Phosphate) de la membrane plasmique cellulaire, permettant aux protéines Ras de réguler leurs cibles membranaires notamment les canaux calciques de type L pour les RGK [Heo et al., 2006]. Cette hypothèse a été partiellement confirmée dans une étude qui montre une forte diminution de l'impact de Rem et Rem 2 sur le canal calcique et leur localisation subcellulaire lorsque ce domaine était tronqué [Corell et al., 2007].

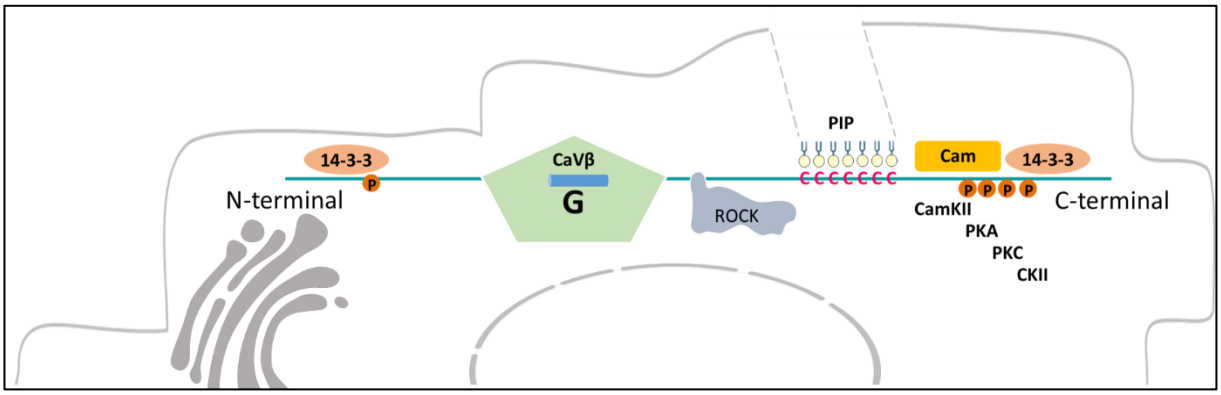


Figure 13 : Sites d'interaction et de phosphorylation des différents partenaires protéiques de Rad

Modulation de l'expression de Rad

Comme pour les autres membres de la famille des protéines RGK, les variations d'expression de Rad ont été corrélées à de nombreux phénomènes physiopathologiques. En l'absence de protéines de régulation de leur cycle d'hydrolyse du GTP, il semblerait que la régulation de la fonction de cette famille se fasse via la régulation de leur expression, leur localisation subcellulaire et par le biais d'interactions avec des partenaires.

Dans le cœur, Rad est sous-exprimée en cas d'hypertrophie ventriculaire associée à une insuffisance cardiaque [Chang et al., 2007]. Quand Rad est surexprimée, la sécrétion du CTGF par les cardiomyocytes diminue car Rad régule négativement sa transcription en séquestrant son facteur de transcription C/EBP-δ en dehors du noyau, régulant ainsi le développement de la fibrose cardiaque [Zhang et al., 2011]. Par ailleurs, son activité a été associée à de multiples

voies de signalisations intervenant dans le contrôle de l'homéostasie calcique et du cytosquelette d'actine [Corell et al., 2008].

- Régulation de la transcription

Au cours du développement, Rad semble être impliquée dans la genèse des myotubes du muscle squelettique, phénomène démontré sur des lignées C_2C_{12} dans lesquelles l'expression de Rad augmente très fortement au cours de la différentiation en myotubes puis diminue, après que la différentiation soit accomplie [Zhu et al., 1996]. Ces résultats ont été appuyés par une étude menée 10 ans plus tard par Hawke et ses collaborateurs sur les capacités de régénération du muscle squelettique après une lésion. L'expression de Rad a été mesurée et comparée entre des cellules progénitrices myogéniques et des extraits protéiques issus de muscle squelettique différencié. La quantité de Rad dans les cellules progénitrices est significativement plus élevée que celle quantifiée dans le muscle différencié. De plus, Rad semble être exprimée au cours de l'embryogénèse et cette expression est limitée au lignage musculaire. L'implication de 3 facteurs de transcription a été démontrée dans ce phénomène : MyoD (Myogenic Differenciation), MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2C) et MyF-5 (Myogenic Factor 5). Ces trois facteurs augmentent l'expression de Rad en se fixant sur le promoteur du gène dans les cellules musculaires après une lésion [Hawke et al., 2006].

- Régulation épigénétique

Un nombre croissant d'études rapportent l'implication de Rad dans le développement de cancers dans de multiples organes, notamment dans le cancer du poumon et du sein dans lesquels Rad joue le rôle de régulateur de la propagation et de la croissance des cellules cancéreuses. Il a été montré dans une étude de Suzuki et ses collaborateurs que dans 30 lignées de cellules cancéreuses pulmonaires et 10 lignées de cellules issues de cancers du sein, l'expression de Rad est significativement diminuée en comparaison avec l'expression mesurée sur les tissus sains. Cette diminution serait due à une augmentation de la méthylation du gène codant RRAD en parfaite corrélation négative avec une diminution de la quantité d'ARNm Rad. Cette augmentation de la méthylation a été vérifiée sur des biopsies de tumeurs primaires du poumon de patients fumeurs et non-fumeurs, et la méthylation du gène Rad augmente si le patient est fumeur [Suzuki et al., 2007].

- Modèles d'étude :

Dans le but d'investiguer les fonctions de la protéine Rad et son implication dans les différentes pathologies auxquelles cette protéine a été liée, des modèles de souris transgéniques ont été générés. La souris *Knock out* (KO) pour Rad a montré une augmentation de l'épaisseur des parois ventriculaires associée à une meilleure fonction contractile et une fraction d'éjection préservée avec l'âge. Une augmentation de la densité du courant calcique de type L a été observée avec une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique et une adaptation de la machinerie de recapture du calcium [Manning et al., 2015]. La même équipe avait montré en 2013 que ces souris présentaient un ralentissement du rythme cardiaque à l'ECG sans l'apparition de troubles du rythme malgré la libérations spontanées de calcium en diastole au cours des enregistrements de transitoires calciques sur les cardiomyocytes isolés à partir de ces souris. Ces libérations de calcium diastoliques ont été reversées par l'administration de KN93, inhibiteur de la CamKII, ce qui implique que Rad joue un rôle dans la voie de la CamKII. Régulation jointe à celle que Rad exerce sur la PKA avec laquelle il interagit, l'empêchant de phosphoryler RyR2 [Manning et al ., 2013 ; Yamakawa et al., 2014]. Ces observations mettent l'accent sur l'importance de la régulation de Rad dans l'homéostasie calcique au cours du cycle cardiaque. L'absence de Rad chez ces souris induit une perte de la sensibilité à la stimulation β-adrénergique, et une surexpression de Rad dans des cardiomyocytes en culture atténue la capacité de la stimulation β-adrénergique à augmenter le courant calcique [Wang et al., 2010].

De façon surprenante, l'expression de la mutation dominante négative S105N de Rad ne produit pas les mêmes effets que le KO mais engendre un phénotype plus drastique sur la fonction électrique du cœur. En effet, le modèle murin Rad S105N présente un prolongement de l'intervalle QT avec un allongement de la durée du potentiel d'action, une augmentation des fuites calciques du RS en diastole corrélées avec l'apparition de post dépolarisations précoces et des extrasystoles à l'ECG ainsi que des pauses sinusales et des blocs auriculo-ventriculaires. Il est démontré dans cette étude, que le phénotype observé est dû à une perte de la régulation négative de Rad sur $Ca_V1.2$, car le couplage constitutif de Rad S105N au GDP l'empêche de séquestrer la sous-unité Cavβ2. La conséquence biochimique est un remodelage de l'expression des canaux ioniques en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire, une augmentation de l'expression de Cav1.2, une diminution du courant I_{to} et une diminution

de l'expression des connexines. L'ensemble de ces changements explique une grande partie du phénotype observé [Yada et al., 2007].

4. Les cardiomyocytes dérivés d'IPSC :

4.1. Les cellules souches :

4.1.1. Les cellules souches embryonnaires pluripotentes :

La pluripotence est un état dans lequel les cellules de mammifères sont capables de générer les lignées cellulaires spécialisées dans la formation des différents organes de l'organisme tout en se maintenant dans cet état pendant une durée indéterminée. Leur pluri-identité oscille constamment entre une différenciation en cellules spécialisées et un maintien du statut de cellules pluripotentes. Cet équilibre est finement régulé par des facteurs génétiques, biochimiques et environnementaux. L'ensemble de ces facteurs est soumis à une hiérarchie spatiotemporelle qui définit l'ordre des évènements qui vont mener à la formation de l'organisme adulte.

Le potentiel pluripotent des cellules souches embryonnaires a longtemps suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Outre la nécessité de comprendre les mécanismes du développement et de l'évolution de l'organisme, la capacité de ces cellules à générer tout type de cellule différenciée offre des perspectives de recherche considérables, notamment dans le domaine de la médecine régénérative, les études génétiques, toxicologiques et d'ingénierie tissulaire. Deux groupes concurrents ont isolé les premières cellules pluripotentes murines en 1981. Après implantation dans des blastocystes de souris, ces cellules se sont parfaitement intégrées dans l'embryon chimère et se sont différenciées en cellules spécialisées et fonctionnelles [Evans and Kaufman., 1981 ; Martin 1981].

Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) sont issues de l'amas cellulaires formés au stade blastocyste au jour 4-5 après la fécondation. L'isolement de ces cellules implique la destruction totale du blastocyste ce qui a causé très rapidement des difficultés éthiques pour les expérimentateurs qui amènent à déterminer si le blastocyste à J5 possède les mêmes droits légaux qu'un humain plus développé. D'un autre côté, l'avancée majeure que peuvent apporter ces cellules dans la résolution de maladies graves est aussi à prendre en compte. Aucun consensus sur la question n'a pu être établi à ce jour et la législation sur

l'obtention d'embryons surnuméraires varie selon les pays [Thomson et al., 1998 ; Ilic et al., 2016] .

4.1.2. *Les cellules souches pluripotentes induites :*

Devant cette limite non négligeable, il a fallu trouver un moyen efficace, reproductible et surtout éthique pour obtenir des cellules similaires aux cellules hES avec le même potentiel de différenciation et de pluripotence, sans avoir recours à l'utilisation d'embryons humains. C'est ce qu'a réussi à accomplir le groupe de Yamanaka, d'abord en 2006 à partir de fibroblastes de souris adultes, puis en 2007 à partir de fibroblastes humains [Takahashi and Yamanaka., 2006 ; Takahashi et al., 2007]. En utilisant simplement quatre facteurs de transcription (KLF4, OCT3/4, SOX2 et C-Myc), Yamanaka et ses collaborateurs ont réussi à dédifférencier des fibroblastes matures en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) capables d'exprimer des facteurs embryonnaires tels que TRA1-60 ou SSEA-1 mais aussi de se diviser à l'infini en maintenant leur pluripotence. Depuis, plusieurs protocoles de reprogrammation de différent types cellulaires facilement obtenus à partir d'urine, de sang ou de peau, ainsi que différentes méthodes d'introduction des facteurs de transcription - virus, ARN nus, CPP (Cell Penetrating Peptides) - ont été publiés [Yu et al., 2013 ; Chari et al., 2016 ; David et al., 2014, Mall et al., 2017]

La mise au point des iPSC est une avancée majeure en recherche biomédicale, qu'il s'agisse de médecine régénérative, d'embryologie et développement ou de tests pharmacologiques. L'étape suivante a été de différencier les iPSC en cellules somatiques (neurones, cardiomyocytes, hépatocytes….) matures et fonctionnelles (figure 14). Ainsi, plusieurs protocoles ont été mis au point, mettant en jeu des médiateurs chimiques du développement des différents organes pour différencier des cellules cardiaques, neuronales, hépatiques, endothéliales, osseuses…… Néanmoins, les cellules obtenues, bien qu'elles présentent des propriétés morphologiques et fonctionnelles similaires aux cellules matures, restent à un stade de différenciation moins avancé [Hamazaki et al., 2017].

Cette limite reste problématique dans le domaine de la médecine régénérative au vu des risques tératogènes encourus après l'injection de cellules immatures dans l'organe lésé d'un individu donné. Par ailleurs, ces cellules restent un bon outil d'investigation en tant que modèle cellulaire pour élucider des mécanismes impliqués dans des pathologies encore mal caractérisées, qu'elles soient héréditaires ou acquises.

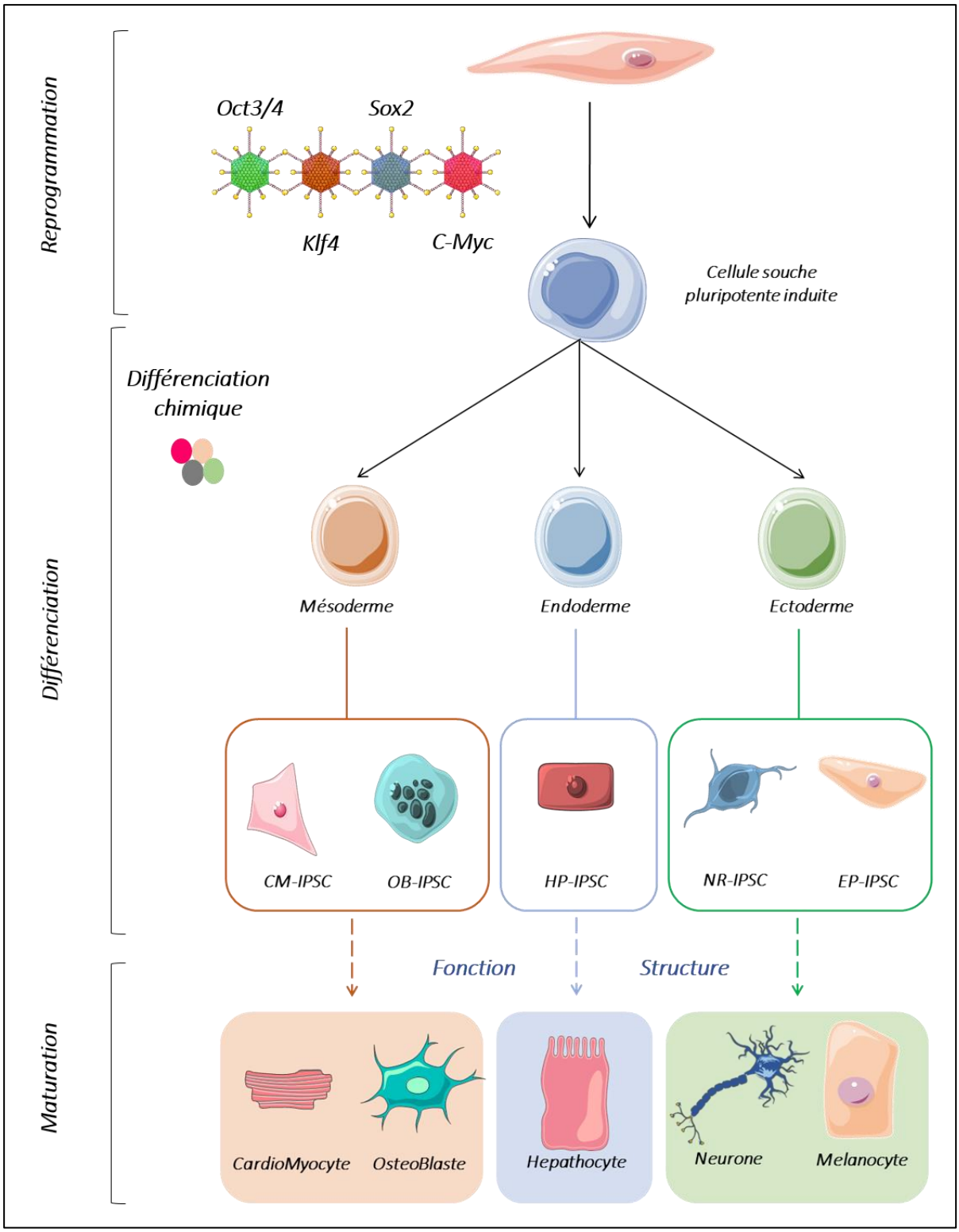


Figure 14 : étapes d'obtention de cellules différenciées à partir de cellules souches pluripotentes induites.

CM-IPSC : cardiomyocytes différenciés d'iPSC. OB-IPSC : ostéoblastes dérivés d'iPSC. HP-iPSC : Hepatocytes dérivés d'iPSC. NR-iPSC : Neuroblastome dérivés d'IPSC. EP : cellules d'epiderme dérivés d'IPSC

4.2. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC :

4.2.1. La différenciation cardiaque :

Kehat et ses collaborateurs furent les premiers à différencier des cardiomyocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Cette différenciation ne fut pas très efficace et le peu de cardiomyocytes obtenus n'avaient pas atteint le stade de cardiomyocytes matures. Quelques années plus tard, une étude électrophysiologie de ces cellules a montré la présence de cellules auriculaires, ventriculaires et nodales. Néanmoins, toutes présentaient une activité électrique spontanée, propriété des premiers stades de différenciation cardiaque [Kehat et al., 2001 ; He et al., 2003]. L'un des premiers protocoles de différenciation à avoir été mis au point après la génération des iPSC fut le protocole de différenciation cardiaque. Au cours de l'embryogenèse, les cellules cardiaques passent par plusieurs étapes de développement avant d'atteindre leur statut de cardiomyocytes matures. Cette maturité est complexe à définir car elle englobe différents aspects de la structure et de la fonction des cellules différenciées. Une maturité morphologique doit être atteinte afin d'accomplir la fonction contractile qui caractérise les cellules musculaires, mais aussi une maturité électrique qui va permettre à ces cellules d'enclencher leur activité mécanique de façon spontanée et de la transmettre aux cellules adjacentes [Yoshida et al., 2017].

En fonction du protocole de différenciation utilisé, les cardiomyocytes dérivés d'iPSC atteignent un degré de maturité qui leur permet d'acquérir une aptitude à se contracter en permanence à des fréquences cardiaques comparables à celles de l'espèce à partir de laquelle les cellules somatiques ont été prélevées. Néanmoins, cette maturité électromécanique reste insuffisante devant les contraintes fonctionnelles qu'un cœur mature aurait à accomplir et devant la complexité de certaines maladies cardiaques.

Plusieurs stratégies de différenciations ont été mises au point afin d'atteindre le meilleure pourcentage de cellules différenciées avec une efficacité de différenciation suffisante pour atteindre un degré de maturité optimal. Bien que ces protocoles utilisent des agents de différenciation différents, les cellules différenciées passent par les mêmes stades d'évolution [Mummury et al., 2003]. Les cellules iPS passent d'abord par une phase de ralentissement de la prolifération, qui peut se faire soit par déplétion des cellules nourricières parmi lesquelles les colonies poussent, soit par réduction de la quantité de facteurs de croissance inclus dans la matrice sur laquelle elles sont ensemencées. Puis ces cellules passent

par une transition épithélio-mésenchymateuse après l'administration de facteurs d'orientation spécifiques du mésoderme cardiaque notamment impliqués dans la voie du TGFβ. Comme toutes les autres voies de différenciation embryonnaire, la différenciation cardiaque est aussi modulée négativement par des glycoprotéines sécrétées appartenant à la famille des Wnt (sauf Wnt 11 qui est cardiogénique). Des inhibiteurs de cette voie sont administrés systématiquement dans les protocoles de différenciation dès que les cellules sont engagées dans le programme cardiaque (figure 15). Par ailleurs, les agonistes du récepteur au FGF jouent un rôle clé dans l'orientation morphogénique des cellules progénitrices cardiaques en activant des voies de signalisation impliquant des médiateurs cardiogéniques tels que *indian* ou *sonic* [Puceat et al., 2005, Burridge et al., 2014]. Il semblerait néanmoins que pour atteindre un degré de maturité terminal, les cellules cardiaques dérivées d'iPSC doivent percevoir des stimuli provenant du microenvironnement dans lequel elles se développent. Ces stimuli se déclinent en signaux chimiques, électriques et mécaniques envoyés par les cellules adjacentes (cardiomyocytes, fibroblastes, cellules endothéliales…..) qui font partie du programme cardiogénique amorcé au cours de la différenciation et qu'on retrouve parmi la population de cellules différenciées à partir d'iPSC [Feaster et al., 2015 ; Yang et al., 2014].

Tableau 5 : Similitudes et différences entre les CM-iPSC et les CM adultes (modifié à partir de Knollmann 2013)

Aspects		*Similarités avec CM adultes*	*Différences avec CM adultes*
Electriques	*Canaux ioniques*	Expression de la majorité des canaux. Courants I_{Na}, I_{Ca}, I_{Kr}, I_{Ks} et I_{to}	Courant I_f important Courant I_{K1} très faible, voire absent
	Homéostasie calcique	CICR fonctionnel, compartimentation des stocks calciques intracellulaires	Relarguage calcique IP3 sensible majoritaire Battements spontanés et faible contractilité
Structuraux	*Appareil contractile*	Expression de toutes les protéines du sarcomère	Localisation non organisée des protéines du sarcomère Pas de tubules T ni de triades
	Morphologie générale	Présence de striations et de connexions intercellulaires	Cellules en étoile et de petite taille, pas de distinction entre les membranes latérales et les discs intercalaires

CICR : Calcium induced Calcium released, CM : Cardiomyocytes

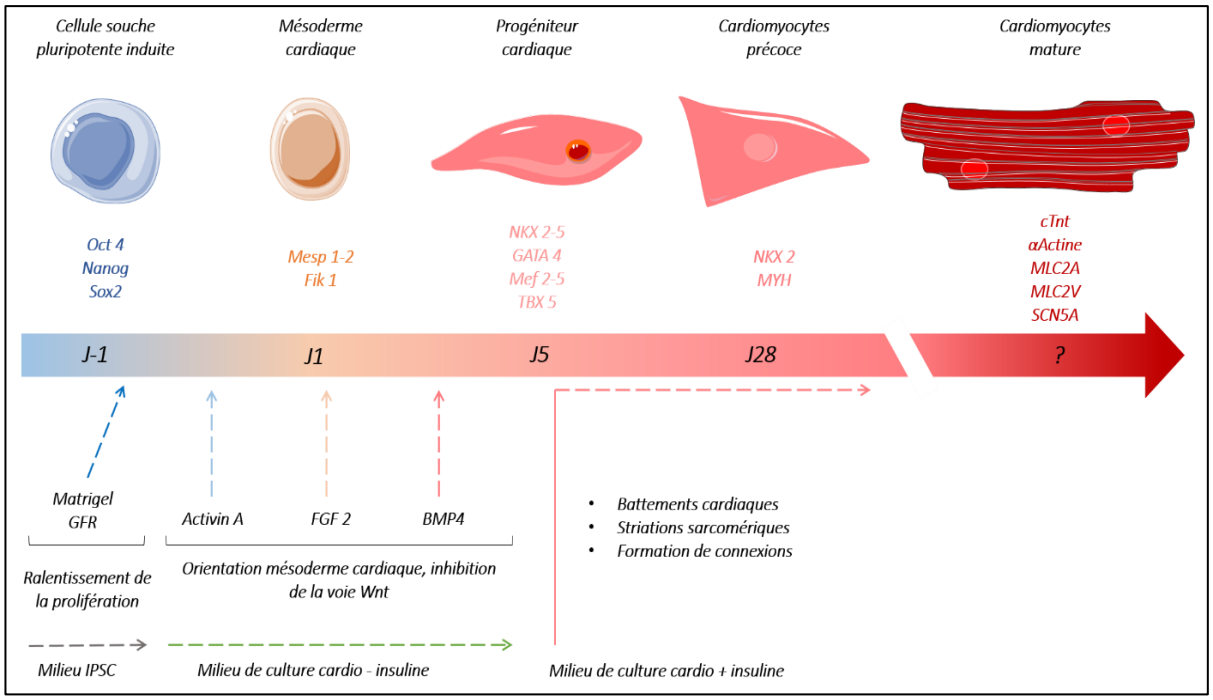


Figure 15 : Différenciation cardiaque à partir de cellules iPS.

Facteurs de transcription impliqués et acteurs chimiques utilisés dans le protocole de différenciation cardiaque.

4.2.2. Les CM-iPSC en tant que modèle d'étude des troubles du rythme :

La recherche cardiovasculaire appliquée à l'homme a toujours été limitée par la difficulté d'obtenir des échantillons biologiques, échantillons qui sont soit prélevés en toute petite quantité par des méthodes invasives, soit obtenus *post mortem*, ce qui induit un biais considérable dans les expérimentations.

Les cardiomyocytes issus d'iPSC présentent une opportunité unique de modéliser des maladies cardiaques à l'échelle cellulaire. Ce modèle offre une flexibilité d'utilisation permettant de choisir l'espèce, le patrimoine génétique, et le stade de développement adéquat au cours de la différenciation. Ce modèle est le premier à permettre d'étudier et de traiter une pathologie donnée de manière patient spécifique avec la possibilité de comparer les données obtenues avec des contrôles intra- et extrafamiliaux. De plus, avec le développement récent de nouvelles technologies d'ingénierie génétique telles que CRISPR/Cas 9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats), il devient désormais possible d'étudier des mutations de manière très fine et de les corriger dans les cellules issues des patients atteints. Plusieurs études utilisant cet outil ont été menées pour du phénotypage de variants impliqués dans des syndromes cardiaques, des tests de toxicité pharmacologique et de l'ingénierie tissulaire [Goedel et al., 2017].

- Modéliser les troubles du rythme monogéniques :

Les troubles du rythme cardiaque héréditaires se déclinent en trouble du rythme monogéniques et polygéniques complexes. Les troubles du rythme monogéniques, bien que largement caractérisés dans des modèles cellulaires et animaux, constituent un bon moyen de valider l'utilisation des cardiomyocytes dérivés d'iPSC. En effet, les modèles d'expression hétérologues permettent de discriminer l'implication d'une mutation à l'échelle de la fonction de la protéine mais l'absence des partenaires directs et indirects de cette protéine élude une partie plus ou moins prononcée du phénotype induit. Par ailleurs, les modèles animaux, bien qu'apportant la dimension de l'organe et l'organisme entier, sont limités par les différences inter-espèces des propriétés électrophysiologiques étudiées [Tamargo et al., 2007]. De manière plus importante, aucun de ces modèles n'offre une expression endogène des mutations étudiées et les manipulations génétiques utilisées pour induire leur expression peuvent provoquer des biais expérimentaux. Les CM-iPSC semblent offrir un compromis acceptable entre toutes ces limites et ont déjà été utilisés pour modéliser des pathologies telles que le syndrome du QT long, la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique (CPVT) et la dysplasie arythmogène du ventricule droit (ARVC) [Dell'Era et al., 2015 ; Goedel et al., 2017 ; Knollmann 2013 ; Moreau et al., 2016]. Ces études ont permis d'identifier les conséquences fonctionnelles des mutations causales sur les propriétés des courants ioniques touchés mais aussi sur l'activité électrique globale de la cellule (potentiel d'action). Malgré l'immaturité des cellules cardiaques dérivées d'iPSC, la plupart des canaux ioniques impliqués dans la fonction électrique cardiaque sont exprimés et localisés à la membrane plasmique et le phénotype décrit est cohérent avec les effets observés dans d'autres modèles pour la même mutation.

- Développement de stratégies thérapeutiques :

D'un autre côté, ces pathologies présentent l'avantage d'apporter une lecture linéaire du phénotype induit par la mutation et donc une occasion de tester des molécules pharmacologiques afin d'atténuer l'effet de ces mutations, du moins au niveau cellulaire, sur la fonction cardiaque. Ainsi, des inhibiteurs sodiques comme la Mexilétine et la Flécainide ont permis de diminuer le courant sodique retardé responsable de l'allongement de la repolarisation cardiaque chez les patients atteints du syndrome de QT long de type 3. Le Dantrolène et la Nifédipine ont réduit l'apparition d'évènements calciques (fuites du RS, EAD)

dans la CPVT et dans le syndrome de QT long de type 2 respectivement. L'utilisation de ces cellules a aussi permis de valider l'utilisation de nouvelles molécules telles que la Roscovitine qui a montré des propriétés inactivatrices du courant calcique de type L, permettant ainsi d'atténuer l'allongement du QT chez des patients atteints de LQT 8 [Goedel et al., 2017] (Tableau 6). Outre les solutions pharmacologiques, l'utilisation des outils d'édition génique telles que les TALENs (Trascription Activator-like Effector Nucleases), les ZFN (Zinc-Finger Nucleases) et les CRISPR, offrent la perspective de corriger les mutations dans les cellules iPS des patients atteints, ce qui constitue un contrôle isogénique idéal pour confirmer l'implication des mutations étudiées [Hendriks et al., 2016]. De plus, ces stratégies peuvent ouvrir des voies de thérapie génique et de médecine régénératrice notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et la mise au point de patchs cardiaques totalement issus des cellules du patient malade [Bellin et al., 2013 ; Limpitikul et al., 2016].

- Modéliser les troubles du rythme polygéniques :

Les troubles du rythme polygéniques sont des pathologies complexes à investiguer car leur phénotype est le résultat de l'effet de plusieurs variations génétiques qui vont participer aux symptômes à des degrés variables. Parmi ces pathologies, la fibrillation atriale et le syndrome de Brugada sont d'assez bons exemples pour illustrer la complexité génétique du phénotype observé [Ellinor et al., 2010 ; Jabbari et al., 2015, Bezzina et al., 2013]. Les signes cliniques apparentés, bien que portants une signature commune, sont liés à plusieurs mutations différentes et ces mutations peuvent être non pénétrantes au sein de la même famille. De manière plus intrigante, les cas de phénocopies soulignent la présence d'un élément sous-jacent non identifié qui provoque l'apparition de la maladie malgré l'absence de la mutation découverte au sein de la même famille. Dans ce cas de figure, les cardiomyocytes dérivés d'iPSC apportent l'avantage d'inclure tout le patrimoine génétique du patients atteint, l'information génétique étant préservée au cours des différentes étapes de reprogrammation et de différentiation, ce qui en fait un modèle pertinent pour une étude phénotypique à l'échelle cellulaire mais pas pour discriminer l'implication de la mutation suspectée. Il faut pour cela produire une lignée cellulaire isogénique dérivée de celle du patient atteint avec une correction de la mutation suspectée et parallèlement, la stratégie idéale serait d'induire l'expression de la mutation dans un contrôle extrafamilial pour prouver que la mutation est causale indépendamment de son environnement génétique.

Tableau 6 : les CM-iPSC en tant que modèle d'étude de 8 pathologies rythmiques publiées

Pathologie	*Type*	*Gène*	*Phénotype*		*Test pharmacologique*	
			Mécanisme	*Nouveau*	*Molécule*	*Refs*
QT Long	1	*KCNQ1*	Prolongement de la durée du PA, EAD, Diminution d'I_{Ks} Anomalie de la localisation de KCNQ1	Oui, données sur le PA pour des mutations identifiées	non	Moretti et al., 2010 Egashira et al., 2012
	2	*KCNH2*	Prolongement de la durée du PA, arythmies Diminution d'IK_r	Non	Nifedipine Pinacidil Ranolazine Nicorandil	Matsa et al., 2011 Lahti et al., 2012
	3	*SCN5A*	Augmentation d'I_{NaL}, accélération de la levée d'inactivation d'I_{Na}. Prolongement de la durée du PA. Diminution de la probabilité d'ouverture du canal Nav1.5	Oui, identification d'une nouvelle mutation.	Non	Malan et al., 2011 Terrenoire et al., 2013
	8	*CACNA 1C*	Ralentissement de l'inactivation d'I_{CaL}, augmentation du transitoire calcique, prolongement de la durée du PA, DAD.	Oui, apparition de DAD sur les PA	Roscovitine	Yazawa et al., 2011
QTL-SBr	-	*SCN5A*	Diminution d'INa, augmentation INaL et prolongement de l'APD	Non	Non	Davis et al., 2012
CPVT	1	*RYR 2*	Augmentation du calcium intracellulaire diastolique, augmentation des fuites calciques du RS, DAD, EAD	Oui, identification d'une nouvelle mutation et apparition des EAD dans les PA.	Flecainide Dantrolene	Fatima et al., 2011 Jung et al., 2012
	2	*CasQ2*	Transitoires calciques aberrants, perturbation de l'ultrastructure du RS et des myofibrilles	Non	Non	Novak et al., 2012 Novak et al., 2015
ARVC	-	*PKP2*	Perturbation de l'expression et de la localisation de PKP2. Ralentissement du rythme en présence de Nifédipine	Non	Non	Ma et al., 2013. Kim et al., 2013

Abréviations : PA : Potentiel d'Action ; EAD : Early After Depolarization ; DAD : Delayed after depolarization; RS : Reticulum Sarcoplasmque; PKP2 : Plakophilline 2.

4.2.3. Limites du modèle :

L'absence de différenciation en types cellulaires spécifiques du tissu auriculaire, ventriculaire et nodal et, de façon plus subtile, spécifiques du cœur droit ou du cœur gauche, marque la première limite de ce modèle. De la même façon, on ne peut distinguer les cellules des couches sous-endocardiques, myocardiques et sous-épicardiques, distinction importante dans l'étude de syndromes mettant en jeu les gradients d'expression transmurale des protéines tels que le syndrome de Brugada [Liang et al., 2016]. Sur le plan électrophysiologique, ces cellules présentent les propriétés électriques d'une cellule cardiaque embryonnaire, ce qui confirme leur maturité incomplète.

Dans le cadre de la caractérisation des troubles du rythme cardiaque, la grande limite de ce modèle réside dans cette immaturité électrique qui se traduit par un potentiel de repos environnant les -60 mV au lieu des -80 mV qui caractérisent les cardiomyocytes adultes, un courant potassique rectifiant entrant très faible et un courant pacemaker important. La gestion du calcium intracellulaire est similaire à celle des cardiomyocytes adultes, mais les propriétés de stockage de ce calcium sont régulés différemment et seraient plus sensible à la voie de l'IP3 Kinase [Yoshida et al., 2017]. Cette augmentation de la sensibilité à la voie de l'IP3 kinase n'est retrouvée que dans les cardiomyocytes de cœurs insuffisants [Zima et al., 2004]. Néanmoins, aucune étude n'a caractérisé la machinerie de l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes dérivés d'iPSC à ce jour et l'absence de tubules T organisés à proximité du RS laisse supposer une gestion calcique anormale [Lee et al., 2011]. Les potentiels d'action enregistrés sur ces cellules présentent des cinétiques mixtes entre les cardiomyocytes du compartiment ventriculaire, atrial et nodal. Des paramètres d'analyse permettent de séparer les cellules qui tendent vers un type ou un autre, mais ces méthodes sont limitées par les modifications que pourraient engendrer des mutations touchant l'activité électrique.

Sur le plan métabolique, la production d'énergie des cardiomyocytes dérivés d'iPSC dépend de la glycolyse alors que celle des cardiomyocytes matures est basée sur la β-oxydation des acides gras. Ceci combiné au faible nombre de mitochondries dans ces cellules, laisse supposer que la coordination entre la stimulation électrique et la réponse mécanique pourrait être limitée par des contraintes d'ordre énergétique [Tohyama et al., 2017a and b ; Kuppusamy et al., 2015].

Au niveau structural, ces cellules ne présentent pas l'organisation des tubules T et l'organisation sarcomérique des cardiomyocytes adultes matures. Des stratégies de maturation ont été proposées par le groupe de Gordon Keller, telles que la culture sur des micro-motifs ou la culture 3D mais les cardiomyocytes soumis à ces approches restent immatures sur le plan électrique [Nunes et al., 2013]. Cette maturation structurale semble d'autant plus difficile à obtenir lorsque l'on constate que même des cardiomyocytes adultes matures se dédifférencient en myofibroblastes seulement quelques jours après isolement enzymatique [Mitcheson et al., 1998]. D'autres stratégies de maturation consistent à soumettre les cellules à une stimulation électrique permanente pour améliorer leur contractilité [Hirt et al., 2014]. Cette maturité peut aussi être enclenchée par l'imposition d'un stress mécanique constant mimant les battements cardiaques [Nunes et al., 2013].

Une autre limite à soulever est l'hétérogénéité fonctionnelle observée entre les lignées cellulaire différenciées à partir du même patient, ce qui laisse supposer que des paramètres environnementaux non contrôlés peuvent influencer l'évolution de ces lignées de manière non homogène impactant leur phénotype final. De plus, il semblerait que malgré la reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS et leur différentiation en cellule spécialisées, celles-ci gardent une mémoire épigénétique de la cellule somatique d'origine et acquièrent de nouveaux motifs au cours de la reprogrammation [Kim et al., 2017]. Ce constat ouvre la voie au questionnement sur la réelle identité génique des cellules obtenues et sur les degrés d'efficacité de la reprogrammation effectuée, reprogrammation qui est déjà mise en cause sur la persistance de certains marqueurs de pluripotence après la différentiation des cellules. Ceci a mené certains laboratoires à envisager une possibilité de différentiation directement à partir des cellules somatiques surtout lorsque celles-ci proviennent du même feuillet embryonnaire [Chiang et al., 2017].

Stratégie de l'étude :

Les travaux qui suivent visent à déterminer l'implication de la protéine Rad GTPase dans l'apparition des troubles du rythme décrits dans el cadre du syndrome Brugada, et ce, a cause de l'identification d'un nouveau variant situé sur gène RRAD lié à l'apparition du syndrome.

Objectifs 1 : Etablir le rôle de la protéine Rad GTPase dans la fonction électrique et la structure du cytosquelette au sein d'un modèle cellulaire cardiaque.

Objectif 2 : Déterminer l'effet du variant RRAD p.R211H sur la fonction de Rad et ses conséquences sur les aspects électriques et structuraux dans les cardiomyocytes dérivés du patient atteint du syndrome de Brugada.

Objectif 3 : Décrire les conséquences morphologiques et électrophysiologiques induites par ce variant à l'echelle de l'organe entier grâce à la génération d'un modèle murin Knock In pour la mutation R211H (R210H chez la souris).

Matériel et méthodes

La section matériel et méthode du présent manuscrit ne détaille que les expérimentations non présentées dans l'article 1 inclus dans la thèse. Les expérimentations des résultats décrits dans l'article sont détaillées dans la section « Online data supplement», chapitre « supplemental methods ».

- **Stratégie d'investigation génétique :**

L'identification du variant RRAD p.R211H a fait partie des travaux de thèse réalisés par le Dr Vincent Portero qui a effectué son doctorat au sein de l'équipe de génétique cardiovasculaire de l'institut du thorax. Le génome du propositus de la famille dans laquelle le variant RRAD p.R211H a été identifié a subi un séquençage d'exomes qui a permis d'identifier 22562 variants rares. Parmi ces variants, 10412 sont considérés comme induisant un changement fonctionnel dans la structure du produit protéique du gène RRAD (les mutations faux-sens, non-sens, STOP, Frame shift, délétions…). Ces variants ont, ensuite été comparés à une population d'individus contrôles inclus dans la base de donnée ExaC, ce qui a permis de discriminer 217 variants ($p<0.1\%$). Ces 217 variants ont été soumis à une analyse de transmission par descendance qui a permis d'établir quels étaient les variants présents dans les régions partagées par les individus atteints du syndrome de Brugada dans la famille du propositus, ce qui a abouti à la discrimination de 9 variants. Un séquençage capillaire a été effectué pour ces 9 variants afin de vérifier leur présence puis une étude de ségrégation a été effectuée pour chaque variant. Ce qui a permis de sélectionner 5 variants mi-sens potentiellement impliqués dans l'apparition du syndrome de Brugada au sein de cette famille sur le plan statistique. Une analyse de co-ségrégation a ensuite été effectuée pour évaluer la pénétrance de chaque variant avec le phénotype des membres de la famille. Les deux variants présentant la meilleure pénétrance ont été départagés par les prédictions structurales et fonctionnelles de Sift et Polyphen dont les critères se basent notamment sur la conservation du résidu modifié et l'impact potentiel de cette substitution sur la structure et la fonction de la protéine codée.

L'étude de l'implication de la protéine Rad dans le syndrome de Brugada a nécessité la combinaison de trois modèles d'études différents. Un modèle de surexpression a d'abord été utilisé afin d'établir le rôle de la protéine Rad dans un modèle de cardiomyocyte de souris nouveau-nées, et ce afin d'investiguer l'impact qu'une surexpression de la protéine sauvage

pourrait avoir sur la fonction des canaux impliqués dans le syndrome et la structure des cellules étant donné la famille de protéines dont Rad fait partie. Le deuxième modèle permet d'étudier l'impact endogène du variant p.R211H sur la fonction de Rad dont la fonction a déjà été investiguée dans le modèle de surexpression. De plus, ce modèle cellulaire porte la globalité du patrimoine génétique du patient atteint du syndrome chez lequel le variant a été détecté y compris des variants fréquents potentiellement favorables à l'apparition du phénotype. Le troisième modèle qui est une souris transgénique *Knock In* exprimant le variant Rad p.R210H, apporte la dimension de l'organe et de l'organisme entier en plus du fait que cette fois-ci, seul l'effet du variant Rad p.R210H peut être étudié. Les investigations menées sur ce dernier modèle d'étude restent préliminaires et seulement les résultats obtenus sur des souris d'un âge de 15 semaines sont présentés.

1. Modèle de cardiomyocytes de souris nouveau-nées :

1.1. Isolement des cardiomyocytes :

Les cardiomyocytes sont isolés à partir de cœurs de souris âgées de 1 à 2 jours. Après extraction des cœurs, ces derniers sont dissociés à l'aide d'un procédé de dissociation associant une action enzymatique et une action mécanique (Miltenyi Cell Disseociator et le Kit d'enzymes joint). Les cellules sont ensuite transvasées dans un tube Falcon contenant du milieu cardio souris (tableau 7), filtrées puis centrifugées à 600 rpm pendant 8 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 4 ml de milieu cardio complet et distribué dans 2 boites de pétri de 65 mm de diamètre (Nunc). Ces deux boites sont laissées dans un incubateur réglé à 37°C et à 4% de CO2 pendant 2 heures. Cette étape, dite de « pré-plating », permet de laisser les fibroblastes présents dans le produit de dissociation cellulaire adhérer au fond des boites. Cette étape permet d'en éliminer une grande partie, puisque les cardiomyocytes n'adhèrent pas au fond des boites. La durée de cette étape peut être ajustée en fonction de l'importance du rendement cellulaire obtenu à l'issue de la dissociation. Après cette étape, les cardiomyocytes sont récupérés, comptés et ensemencés selon la confluence adaptée à l'expérimentation prévue (Tableau 8). Les cellules sont ensuite mises en cultures pendant 24 heures avant l'infection.

Tableau 7 : composition des milieux de culture des cardiomyocytes de souris nouveau-nées

Composition	Milieu cardio souris	Milieu d'infection
DMEM	83 %	96 %
Sérum de cheval	10 %	-
Sérum de veau foetal	5 %	2 %
S/P	2 %	2 %

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium; S/P : Streptomycine / Penicilline

Tableau 8 : conditions de culture des cardiomyocytes de souris nouveau-nées infectés selon les expérimentations

Expérimentation	Taille des supports	Nombre de cellules (cellules)	matrice	Durée de l'infection
X-celligence	5 mm de diamètre	35 x 10^3	Fibronectine	3 jours
RT-Q-PCR	30 mm de diamètre	200 x 10^3	Fibronectine	3 jours
Patch-Clamp	35 mm de diamètre	90 x 10^3	-	2 et 3 jours
Immuno-marquages	30 mm de diamètre	200 x 10^3	Collagène	3 jours
Western-blot	75 mm de diamètre	1000 x 10^3	Fibronectine	3 jours

1.2. Infection adénovirale :

L'infection se fait 24 heures après la mise en culture et dure 2 heures. Les adénovirus sont préparés dans un milieu cardio appauvri en sérum afin de fragiliser la membrane des cardiomyocytes ce qui permet de faciliter la pénétration des virus. Afin de caractériser le rôle de la protéine Rad dans un modèle cellulaire cardiaque, nous avons choisi de surexprimer la protéine humaine dans des cardiomyocytes de souris nouveau-nées. La stratégie initiale était d'effectuer une extinction de l'expression du gène Rad murin à l'aide d'un Sh-RNA puis de ré-exprimer le gène humain sain et le gène Rad portant le variant p.R211H.

L'infection de 4 adénovirus a donc été testée

- Ad-GFP : adénovirus portant le gène codant pour la protéine GFP seule (contrôle)
- Ad-WT-RAD : adénovirus portant le gène codant pour la protéine Rad humaine et la GFP.
- Ad-R211H-RAD : adénovirus portant le gène codant pour la protéine Rad humaine avec le variant p.R211H et la GFP.
- Ad-shRad: adénovirus portant le gène codant pour le ShRNA dirigé contre le gène rad murin et la protéine RFP.

Tout d'abord, un série d'infections à différentes MOI (Multiplicity Of Infection, nombre de particules virales par cellule) par virus a été effectuée afin de déterminer la MOI optimale pour obtenir une expression maximale de la protéine sans que cette infection n'induise de cytotoxicité (Tableau 9). L'expression a été mesurée par quantification d'ARN et la cytotoxicité a été évaluée par mesure d'impédance cellulaire durant 3 jours après l'infection (figures 18)

Tableau 9 : conditions d'infection des cardiomyocytes de souris néonatales

Adénovirus	Titration (PFU)	MOI testées
Ad_GFP	4,3 X 10^{10}	25, 50, 75, 100
Ad-WT-RAD	2,7 X 10^{10}	25, 50, 75, 100
Ad-R211H-RAD	2,3 X 10^{10}	25, 50, 75, 100
Ad-shRad	3,4 X 10^{10}	50, 100

1.3. Validation du modèle :

Les résultats des tests de MOI en mesure d'impédance en temps réel (xCELLigence®) pour les 4 conditions d'infection ont été normalisés par rapport à une 5ème condition qui correspond à un groupe de cellules non infectées. L'impédance correspond à la tension électrique exercée par la membrane cellulaire sur la matrice lors de l'adhésion. Elle reflète le degré et la surface de contact des cellules avec le fond du support sur lequel elles sont cultivées. Le fond du support est tapissé à 80% d'électrodes d'or qui permettent de mesurer

ce contact qui s'intensifie à mesure que les cellules adhèrent et prolifèrent après ensemencement.

Au cours des trois premières heures après le début de la mise en culture, les cellules adhèrent au font du support et une augmentation de la tension électrique exercée par les cellules sur ce support est observée. Puis les cellules commencent à proliférer et cette tension augmente plus rapidement jusqu'à atteindre un plateau qui reflète un ralentissement de la prolifération des cellules dû à la saturation de l'espace dans la boite de culture. Le paramètre mesuré est la pente de prolifération cellulaire mesurée lorsque la progression de ce contact cellules/support est au milieu de son expansion (entre 50 et 70 heures après infection).

Les résultats obtenus montrent que la pente de prolifération mesurée pour chaque adénovirus diminue à mesure que la MOI augmente et ce, sans induire une mortalité cellulaire qui se traduirait par une diminution de contact cardiomyocyte/support. Il a aussi été observé que pour la même MOI, quel que soit l'adénovirus utilisé, la pente de prolifération mesurée est comparable entre les différents groupes (Figure 16).

Des mesures de quantité d'ARN du gène Rad humain et murin ont permis d'évaluer dans un premier temps l'efficacité du ShRNA dirigé contre la forme murine de Rad et dans un second temps, de mesurer l'efficacité d'induction de l'expression de la forme humaine de Rad par le gène sauvage et muté (p.R211H). Pour ce faire, des sondes Taqman reconnaissant spécifiquement les formes murine ou humaine de Rad ont été utilisées sur des ADN complémentaires préalablement obtenus par rétrotranscription à partir des ARN messagers extraits des cardiomyocytes infectés.

L'extinction de l'expression du gène Rad murin a été efficace à 60% avec une MOI de 100 particules virales par cellule. Le gène Rad murin semble très peu exprimé à l'état basal, le nombre de cycle nécessaire pour détecter une expression ARN atteint les 40 cycles de PCR alors qu'il en faut 24 pour détecter l'expression de l'HPRT qui a été choisi comme gène de référence. Par ailleurs, l'expression de l'ARN Rad humain induite par l'infection adénovirale d'ad_WT-RAD est 20 000 fois supérieure à celle de Rad murin pour une MOI de 25 particules virales par cellule et augmente de manière linéaire avec l'augmentation de la MOI pour atteindre un facteur de 80 000 pour une MOI de 100. Pour ad-R211H-RAD, l'induction de l'expression de Rad humain semble plus modérée et commence par un facteur de 5 000 pour

une MOI de 25 et augmente jusqu'à atteindre un facteur de 12 000 pour une MOI de 100. Ces calculs sont basés sur le principe que les efficacités de PCR sont identiques pour les deux gènes, ce qui ne peut être affirmé. Malgré cela, on peut sans risque affirmer que l'expression de Rad humain est très supérieure à l'expression de Rad endogène.

Ces résultats ont permis de démontrer qu'une extinction du gène Rad murin était inutile étant donné la faiblesse de l'expression basale de Rad murin et de l'importance de l'expression de Rad humain induite par l'infection des deux adénovirus. Combinés aux résultats de prolifération cellulaire, ces résultats de quantification d'ARN ont permis d'établir qu'une MOI de 100 particules virales par cellule offrait une efficacité d'expression suffisante pour les deux adénovirus testés sans induire de cytotoxicité (Figure 17).

Pour ces analyses de validation de modèle de cardiomyocytes de souris nouveau-nées ainsi que pour toutes les expérimentations de caractérisation effectuées sur ce modèle, les résultats d'un minimum de 3 isolements cellulaires différents ont été analysés séparément puis compilés.

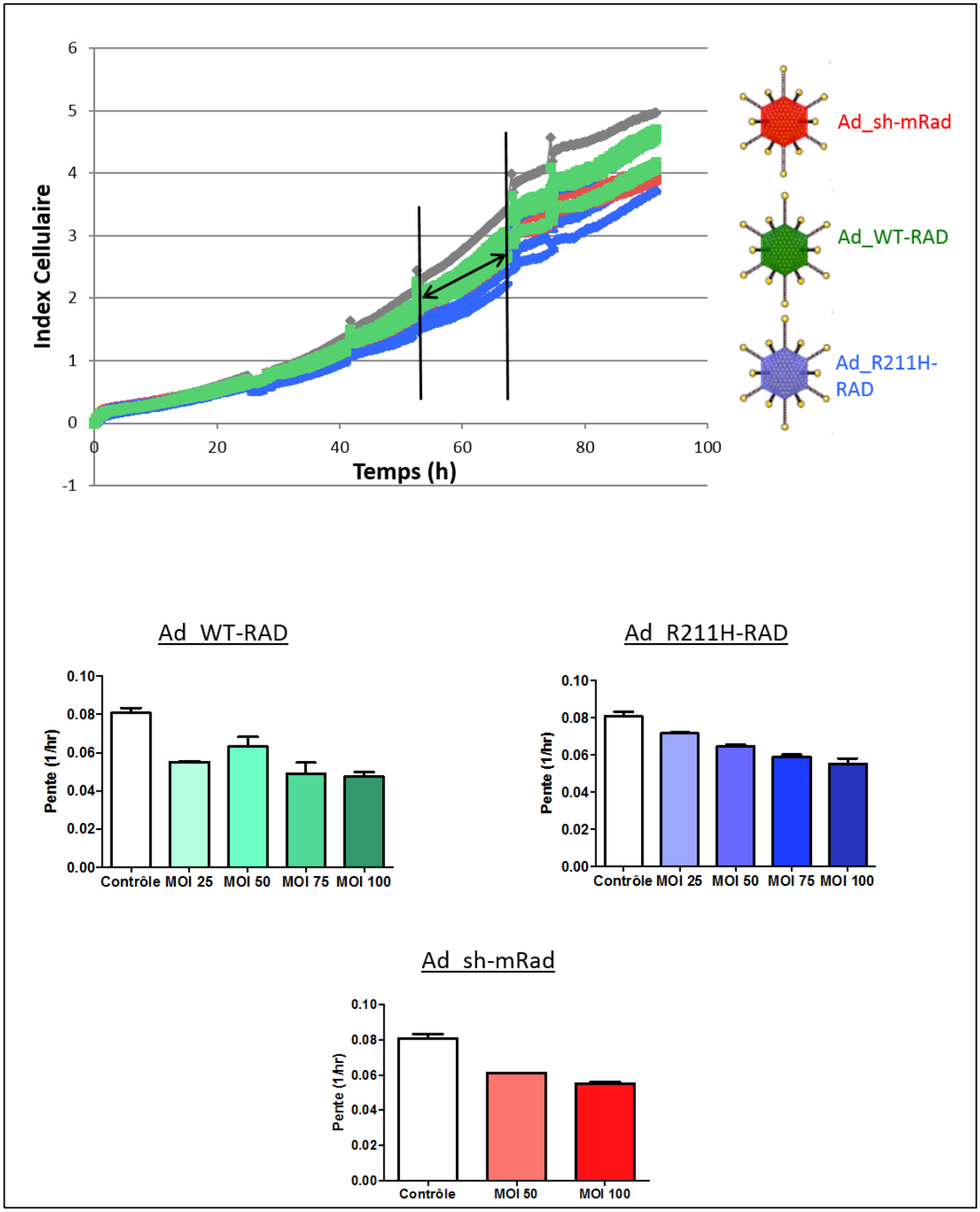


Figure 16 : Résultats des expérimentations d'xCELLigence®

5 conditions expérimentales : cellules non infectées (Gris), cellules infectées avec un ShRNA anti Rad (rouge), cellules infectées avec l'adénovirus ad_WT-RAD (vert) et l'adénovirus portant le gène Rad avec le variant p.R211H (bleu)

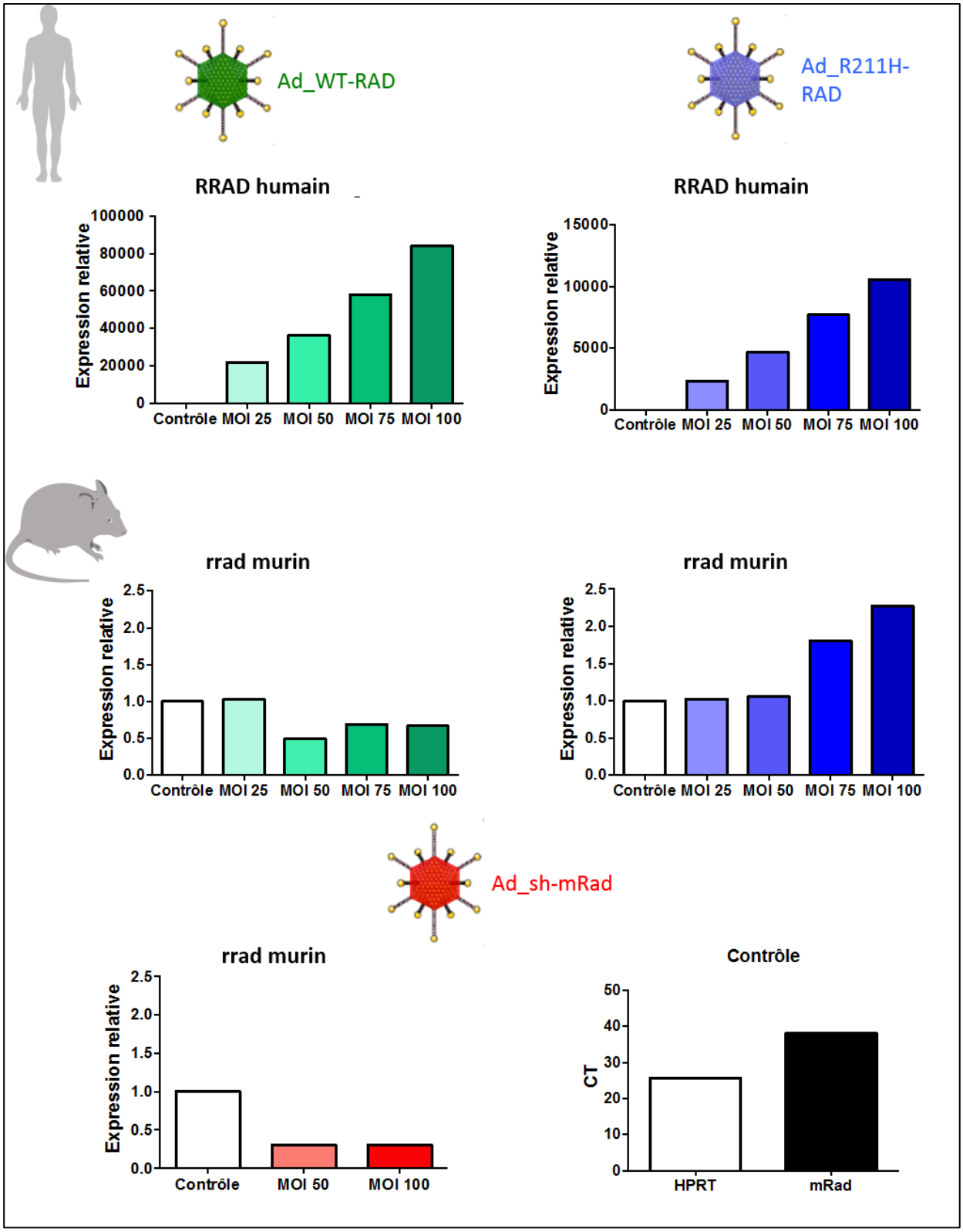


Figure 17 : Quantification d'ARN messager du gène Rad murin et humain dans les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été infectés avec les adénovirus : ad_WT-RAD (vert), ad_R211H-RAD (bleu) et ad_ShRad (rouge). Les résultats bruts de la quantification PCR du gène Rad murin dans les cardiomyocytes non infectés a été ajoutée pour montrer que le gène est très peu exprimé dans des conditions basales.

2. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC :

2.1. La reprogrammation :

Les cellules iPS ont été reprogrammées à partir de monocytes de sang périphérique (PBMC pour Peripheral Blood MonoCyte) prélevés sur un individu porteur du variant Rad p.R211H et sur son frère non porteur du variant (contrôle). La reprogrammation a été effectuée au sein de la plateforme IPSC de Nantes à l'aide d'un kit de reprogrammation non inclusive utilisant des virus Sendai codant pour les facteurs de transcription KLF4, SOX2, OCT4 et C-MYC (CytoTune™-IPS 2.0 Sendai Reprogramming kit, Life Technologies). Les détails de culture et d'amplification sont rapportés dans la section « Online supplemental methods » de l'article 1 (figure supplémentaire 2). La validation des cellules et la confirmation de leur pluripotence sont rapportées en figure supplémentaire 2 du même article

2.2. La différenciation en cardiomyocytes :

Le protocole utilisé dans le but de différencier les cellules iPS en cardiomyocytes s'inspire de la méthode de différenciation en sandwich matriciel de matrigel (Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced, GFR). Le protocole commence quand les cellules iPS atteignent un degré de confluence de 90%. Le matrigel GFR est ajouté à J-1 puis J0 du protocole en plus de cytokines favorisant l'orientation de la différenciation cellulaire vers le programme mésodermal. L'administration d'inhibiteurs de la Voie WINT à J1 permet de compléter cette orientation et le milieu de culture cardio complet : RPMI, L-Glutamine, Pénicilline, Streptomycine, NEAA (Non-Essential Amino Acids) et de B27+insuline. Ce milieu, utilisé de J5 à J28, permet de maintenir les cellules dans le programme de différenciation cardiaque.

2.3. La dissociation :

Les cellules différenciées commencent à battre autour de J10 après le début du protocole et la fin de la différenciation cardiaque est estimée à J28. L'ensemble des manipulations effectuées sur ce modèle s'alignent sur ce délai. Ainsi, les cellules pour le patch-clamp et pour les immunomarquages sont dissociées à J20 par l'administration de collagénase de type II (Gibco), ce qui laisse le temps aux cellules de se remettre de cette dissociation pendant 8 jours. Les boites de pétri utilisées pour le patch-clamp sont préalablement tapissées de matrigel (ESC de chez Cornings) ainsi que les lames IBIDI (ibidi, 8 well chambered coverslips) utilisées pour les immunomarquages.

3. Patch-clamp :

Les cardiomyocytes de souris nouveau-nées sont isolés à J0, infectés à J1 et mis en culture pendant 48 à 72 h. Les expérimentations de patch clamp sont effectuées à J3 et J4. Les cellules sont ensemencées à une confluence de 90 000 cellules par boite de pétri de 35 mm (Nunc) et le milieu de culture est changé 2 fois par jour. Les enregistrements sont effectués à température ambiante (20°C) et les cellules infectées sont détectées grâce à une lampe à fluorescence intégrée dans l'installapation.

Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC sont maintenus à 37°C tout au long des enregistrements de courants et de potentiel d'action cardiaque. Seules les cellules dotées d'une activité contractile spontanée sont sélectionnées. Trois clones iPSC pour le patient portant la mutation deux clones pour l'individu contrôle ont été utilisés. Les cardiomyocytes différenciés à partir de ces clones ont été soumis aux mêmes étapes expérimentales et les données issues de chaque lignée ont été traité séparément puis compilés si similaires pour chaque individu. Les résultats présentant une hétérogénéité entre les clones ont été présentés séparément.

Les courants sodiques et calciques ont été étudiés en configuration cellule entière avec des pipettes préalablement cirées de 2,5 à 4 m□ de résistance, étirées à partir de filaments en borosilicate (Sutter Instrument, OD : 1,15, ID : 0,86) à l'aide d'une étireuse horizontale (Sutter instrument). Les courants artéfactuels (séries) sont compensés et les courants obtenus sont amplifiés par un amplificateur (Axon) relié à une carte d'acquisition (Data Digitizer 1440) permettant le traitement des données par un ordinateur sur lequel est installé un logiciel d'acquisition et d'analyse (PClamp version 10.2). Pour les courants calciques, le filtre passe bas a été réglé à 3kHz et à 10 kHz pour les courants sodiques.

Les cellules sont perfusées avec une solution de Tyrode en circuit clos permettant le renouvellement du bain en permanence grâce à un système d'aspiration. Les cellules sélectionnées pour l'acquisition sont perfusées par une solution extracellulaire dont la composition concorde avec le gradient transmembranaire de concentration sodique désiré. Cette solution est administrée de manière ponctuelle au cours de l'enregistrement grâce à un système de perfusion locale qui permet de régler le débit de perfusion et de perfuser plusieurs solutions car il est constitué de plusieurs voies. Les pipettes sont remplies avec une solution intracellulaire dont Les compositions des solutions extracellulaires (Tyrode et perfusion locale)

et de la solution intrapipette sont détaillées dans le tableau 1 (section « online supplémental methods » dans la partie « online supplemental data » de l'article 1).

Les courants ont été obtenus en imposant un protocole de stimulation pour chaque paramètre étudié (densité, activation et inactivation), le décours de ces protocoles est décrit sur les figures de résultats. L'intervalle entre chaque stimulation était de 2 secondes et le potentiel de repos imposé était de -100 mV.

Les enregistrements de potentiel d'action cardiaque ont été effectués en configuration patch perméabilisé en utilisant de l'amphotherecine B dans la solution intracellulaire introduite dans des pipettes non cirées. Une étape d'enregistrement d'activité électrique spontanée de deux minutes est effectuée avant l'imposition d'une série de stimulations à intervalles de temps réguliers avec une amplitude de stimulation allant de 25 à 50 pA et des intervalles variant entre 400 et 800 ms (selon le phénotype).

4. Les immunomarquages :

Les protocoles d'immunomarquage mis en place pour cette étude diffèrent entre nos deux modèles cellulaires.

Afin de caractériser et de localiser les protéines impliquées dans le phénotype induit par l'infection de la protéine Rad WT et Rad p.R211H, les cardiomyocytes de souris nouveau-nées sont ensemencées sur des lamelles de 25 mm de diamètre déposées au fond des plaques 6 puits (Nunc). Après l'étape d'infection et 3 jours de culture cellulaire, les cellules sont fixéés au paraformaldéhyde 4% pendant 15 min après 3 jours de culture post infection. Les cellules ont ensuite subi 3 lavages au tampon phosphate salin (PBS pour Phosphate Buffered Saline) suivis d'une étape de perméabilisation réalisée avec PBS/Triton X 100 0.2% pendant 15 minutes. Cette étape est suivie de 3 autres lavages au PBS puis d'une étape de saturation réalisée avec une solution de gélatine de poisson froid dilué à 3% dans du PBS pendant 30 minutes. L'incubation des cellules avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine cible se fait dans la même solution de saturation à 4°C sur la nuit (Tableau 10).

L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée après 3 lavages au PBS à température ambiante dans la solution de saturation pendant 1 heure à l'abri de la lumière après dépôt des lamelles dans des chambres humides enrobées de papier aluminium. Les noyaux sont

colorés au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) dilué au 1/1000ème dans le 3ème lavage au PBS qui suit l'incubation de l'anticorps secondaire. Deux autres lavages au PBS suivent cette étape et les lamelles sont montées sur des lames avec du Prolong Gold (Life technology).

Comme décrit précédemment, les CM-iPSC sont dissociés à J20 après le début de la différenciation et sont transférés dans des plaques à 8 chambres (ibidi, 8 wells) dont le font a est tapissé de matrigel (Cornings). Les immunomarquages sont effectués 12 jours après cette dissociation et commencent par une étape de fixation au PFA 4%, puis d'une perméabilisation / saturation avec une solution de PBS/Saponine 5% (Sigma Aldrich) / BSA 10% (Sigma Aldrich). Cette étape est suivie d'une incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS (Tableau 10) pendant 2h à température ambiante puis d'une série de 3 rinçages PBS de 5 min. l'anticorps secondaire et le DAPI sont dilués au 1/1000ème dans du PBS et mis en contact avec les cellules pendant 1h à l'abris de la lumière dans des chambres humides puis une série de 3 lavages PBS de 5 min est effectuée avant de fixer les cellules avec du PFA 0.5%. Les cellules sont maintenues en chambre humide à 4°C jusqu'à l'acquisition au microscope.

L'acquisition des images est effectuée après 24 heures de polymérisation du fixateur en utilisant un microscope à épifluorescence (Carl Zeiss) objectif x40 et les acquisitions 3 dimensions ont été obtenues par microscopie confocale (Nikon A1 eclipse).

Etant donné que les cardiomyocytes de souris nouveau-nées infectées sont détectées grâce l'expression de la GFP, les anticorps secondaires utilisés pour étudier les protéines d'intérêt sont couplé à un fluorochrome émettant aux alentours de 560 ηM (Rhodamine).

Tableau 10 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expérimentations d'immunomarquage

Protéine	Anticorps I (esp)	Fournisseur	Anticorps II (esp)	Fournisseur
Paxilline	Lapin	Abcam	Souris	Santa-Cruz
N-Cadherine	Lapin	Abcam	Souris	Santa-Cruz
Phalloidine-Alexa 560	-	Life Technologies	-	-
Troponine I	Souris	Santa-Cruz	lapin	Santa-Cruz
Rad	Lapin	Aviva Biosystem	Souris	Santa-Cruz
Vinculine	Lapin	Abcam	chèvre	Invitrogen
Phalloidine-Alexa 480	-	Life Technologies	-	-
β-tubuline	Souris	Sigma Aldrich	lapin	Santa-Cruz

5. La RT-Q-PCR :

Pour déterminer quelle MOI est la plus adaptée pour réaliser un KD efficace ou pour induire une expression suffisante de la forme humaine de Rad, l'expression de Rrad a été vérifiée par RTqPCR après extraction des ARN totaux.

5.1. Extraction d'ARN

Le milieu de culture à l'intérieur des plaques 6 puits est retiré. Les puits sont rincés avec du PBS (sans calcium) et le PBS est remplacé par du tampon de lyse RLT contenant du β-mercaptoéthanol. Le fond des puits est ensuite gratté et l'ensemble est transvasé dans des tubes eppendorf préalablement placés à -20°C.

De l'éthanol 70% est ajoutée dans chaque tube pour permettre la précipitation des protéines. Le contenu de chaque tube est déposé sur des colonnes fournies dans le kit *NucléoSpin ® RNA (Macherey-Nagel)*. Les tubes sont centrifugés 15 secondes à 10000 rpm et le filtrat est éliminé. Un 1er lavage est effectué avec du tampon RW1, puis la DNase est ajoutée dans les colonnes et laissée à T° ambiante pendant 30 minutes. Deux lavages consécutifs sont ensuite effectués avec du tampon RPE. Les colonnes sont transférées sur de nouveaux tubes eppendorf 1,5 mL et sont éluées avec de l'eau stérile pendant 1 minute avant d'être centrifugées 1 minute à 10000 rpm. Le filtrat est conservé et l'opération d'élution est répétée une 2nde fois.

5.2. La rétrotranscription

La RT consiste à transformer les ARNm cellulaires en ADN complémentaires (ADNc) grâce à une enzyme, la reverse transcriptase. Ces ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par qPCR. La RT est réalisée à partir de 500 ng d'ARN auquel seront ajoutés 29 µL de mix de RT (Tableau 11).

Les ARN obtenus sont ensuite dosés à l'aide du Nanodrop, dilués dans de l'eau stérile de sorte à obtenir une concentration de 10 ng/µL pour la suite des manipulations et conservés -20°C.

Tableau 11 : Composition du mélange et programme d'amplification de la rétrotranscription

Composants	Quantité pour un échantillon (/tube)	Programme de RT
Buffer RT 10 X	10 µL	**10 min à 25°C**
Random Primer	10 µL	**2h à 37°C**
dNTP (25X)	4 µL	
Transcriptase inverse	5 µL	
Echantillon à tester	71 µL (500 ng)	
Volume total	100 µL	

5.3. Contrôle qualité :

Après dosage des ARN, il est important de vérifier que les ARN ne sont pas contaminés par de l'ADN pour éviter des erreurs d'interprétation et de quantification à la suite de la RT et de la qPCR. Pour cela, une PCR sur le gène de la GAPDH (expression ubiquitaire et constitutive) est réalisée sur chaque échantillon. Une électrophorèse des produits de PCR est alors réalisée sur un gel à 1% d'agarose + BET. Un contrôle positif contenant de l'ADN et un contrôle négatif n'en contenant pas sont ajoutés. Si les échantillons ne sont pas contaminés par de l'ADN, aucune bande ne sera visible après électrophorèse et révélation. Avant de lancer la RT, il est également nécessaire de vérifier la qualité des ARN. Pour cela on réalise une électrophorèse des échantillons d'ARN (100 ng) sur un gel à 2% d'agarose + BET. Si les ARN sont intacts, on observera pour chaque échantillon, deux bandes correspondant aux ARN ribosomaux (ARNr) 18S et 28S.

5.4. La PCR quantitative

Cette technique permet d'amplifier un gène donné grâce à des amorces qui sont spécifiques de ce dernier. On fixe un seuil de détection de l'ADN qui sera donc atteint plus rapidement lorsque la quantité d'ADN initiale présente dans l'échantillon est grande. Dans notre cas, plus le gène Rrad sera exprimé, plus le nombre d'ARNm$_{Rrad}$ sera important et plus la quantité d'ADNc$_{Rrad}$ sera grande également.

6. Quantification des protéines :

Dans cette étude, les protéines issues des trois modèles étudiés ont été extraites, quantifiées et soumises à une révélation par un anticorps spécifique de la cible d'intérêt.

6.1. Extraction de protéines totales

6.1.1. Cardiomyocytes en culture

Les cellules sont immédiatement déposées sur glace à la sortie de l'incubateur et les différentes étapes du protocole d'extraction sont effectuées à 4°C. Après élimination du milieu de culture des cardiomyocytes, un rinçage PBS est effectué et 200 µl de tampon de lyse sont ajoutés dans chaque puits/boite (Tableau 12). Les cellules sont lysées chimiquement mais aussi mécaniquement à l'aide d'un grattoir puis le lysat est transféré dans des eppendorfs préalablement déposés sur glace. Le lysat est homogénéisé sur une roue en chambre froide pendant 15 minutes puis une centrifugation de 15000g est effectuée pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans des eppendorf de 0.5 ml et congelé à -80°C.

6.1.2. Cœurs de souris

Les échantillons tissulaires sont pesés sur glace et le volume de tampon de lyse adapté en fonction du poids (10 µl/mg). L'échantillon est ensuite transféré dans un Potter et le volume de tampon de lyse adapté est ajouté, puis l'échantillon est broyé et le lysat tissulaire obtenu est transvasé dans des eppendorfs étiquetés préalablement placés dans la glace. Ces lysats sont homogénéisés sur une roue placée en chambre froide pendant 15 minutes puis centrifugés à 15000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et répartis dans des eppendorfs de 0.5 ml avant d'être congelé à -80°C

Tableau 12 : composition des tampons de lyse

Tampon de lyse	
Triton X-100 mM (1%)	1.06ml
NaCl (100mM)	0.618g
EGTA (1mM)	0.040g
Tris-HCl (50mM)	0.834g
pH	7.4 avec (NaOH)
H2O	Qsp 100ml
Cocktail enzymatique	
Cocktail inhibiteur de protéase (1/100, P-8340)	100µl
Na_3VO_4 (1mM)	50µl
NaF (50mM)	500µl
PMSF (1mM, P-7626)	100µl
Tampon de lyse	Qsp 10ml (9.25ml)
Tampon hypotonique	
HEPES 500mM	20µl
MgCl2 500mM	3µl
KCl 500mM	2µl
DTT 0.1M	5µl
Cocktail inhibiteur de protéase (1/100, P-8340)	10µl
H2O	960µl

6.1.3. *Fractionnement Cytosol /Noyaux*

Sur les cardiomyocytes dérivés d'iPSC, une série d'expérimentations a été effectuées sur la compartimentation de la protéine Rad dans cardiomyocytes dérivés de l'individu contrôle et de l'individu muté. Afin de réaliser cette séparation, un tampon hypotonique a été utilisé avant la phase d'extraction de protéines avec le tampon de lyse classique afin de précipiter les noyaux et de les isoler de la fraction cytosolique. Les cellules sont lysées dans ce tampon au grattoir puis le lysat obtenu est broyé dans un Potter pour finaliser la rupture de toutes les membranes internes. Les lysats sont transvasés dans des eppendorf de 1.5 ml et centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min puis le surnageant qui correspond à la fraction cytosolique est récupéré dans un autre tube et congelé à -80°C. Le culot en revanche, qui correspond à la fraction nucléaire, est resuspendu dans du tampon de lyse classique (200 µl par tube) puis subi une étape de soniquation avant d'être congelé à -80°C

6.2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées grâce la méthode BCA à l'aide du kit *Pierce® BCA Protein Assay (23225)*. L'absorbance (DO) des échantillons est mesurée et comparée à celle d'une gamme étalon de concentrations croissantes (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 µg/mL) en albumine de sérum bovin (BSA). Les échantillons à tester sont préalablement dilués au ¼ ou 1/6ème. Dans chaque puits de la plaque de dosage, 10 µL d'échantillon (ou de la gamme de BSA) sont déposés en triplicats, auxquels sont ajoutés 200 µL de mélange BCA/$CuSO_4$ et la réaction se fait pendant 15 minutes à 37°C. La lecture de DO est ensuite réalisée grâce au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 560 nm.

6.3. Western Blot

6.3.1. *Préparation des échantillons*

En fonction de l'anticorps utilisé, une étape facultative de dénaturation a été effectuée, les échantillons sont chauffés 5min à 99°C dans un thermobloc (pour certaines protéines 5min à 60°C au bain-marie peut suffire (ex : Nav1.5) Les protéines sont déposées dans des gels pré-coulés (Stain-Free Any KD, BioRad) à une concentration de 40 ug de protéines dans chaque puits. A ces 40 µg sont ajoutés 2 µL de tampon réducteur 10X (NuPAGE Sample Reducing Agent [10X], NOVEX) et 5 µL de tampon dénaturant 4X (NuPAGE LDS Sample Buffer [4X], NOVEX). Le volume est ajusté à 25 µL avec de l'eau stérile. La migration est réalisée à 80 V pendant 1h30,

dans un tampon de migration 1X (Interchim UP91495E: Tris 0,025 M, Glycine 0,192 M, SDS 0,1%).

6.3.2. *Transfert, saturation et incubation*

Une étape d'activation du gel *Stainfree*® permet de visualiser l'ensemble des protéines déposées afin de vérifier l'efficacité de la migration et la qualité des dépôts. Après transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, cette étape de révélation *Stainfree*® est répétée sur la membrane pour vérifier l'efficacité du transfert, sa qualité et obtenir une quantification des protéines globales sur laquelle normaliser la protéine d'intérêt après l'étape d'incubation avec les anticorps. Les protéines sont ainsi transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µM (Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit, Bio-Rad) grâce au système Trans-Blot® TurboTM Transfer System (Bio-Rad) sous 2,5 Ampères et 25 V, pendant 10 minutes. Les membranes sont ensuite saturées pendant 1 h dans 50 mL de TBS-T (Tris-Base 10 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Tween 0,1%) contenant 5% de lait pour bloquer les sites aspécifiques potentiellement reconnus par les anticorps. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T 5% lait, pendant une nuit à 4°C sous agitation (Tableau 14). Après trois rinçages de 10 minutes dans du TBS-T, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante, sous agitation, avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) dilué au 1/10000ème dans une solution de TBS-T 5% de lait.

6.3.3. *Révélation et traitement des données :*

Après trois autres rinçages dans du TBS-T, la membrane est révélée à l'aide du kit de chimioluminescence (GE Healthcare AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent) et placée dans l'automate de révélation de western (ChemiDoc MP Imaging System Bio-Rad) relié à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad). Les données obtenues sont analysées à l'aide du même logiciel qui permet de détecter la bande d'intérêt, de quantifier son intensité de chemiluminescence et de la rapporter au total de protéines détectées dans le *Stainfree*® du puits correspondant.

Tableau 13 : Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les experimentations de Western Blot

Protéine	Anticorps I (esp)	Fournisseur	Anticorps II (esp)	Fournisseur
Rad	Lapin	Aviva System Biology	Souris	Santa Cruz
Nav 1.5	Lapin	Cell Signalling	Souris	Santa-Cruz
ROCK	Chèvre	Abcam	lapin	Santa-Cruz
MYPT	Lapin	Abcam	Souris	Santa-Cruz
P-MYPT (Thr 853)	mouton	Cell Signalling	Souris	Santa-Cruz

7. Le modèle de souris Knock In Rad R210H :

Dans le but de caractériser le phénotype induit par le variant Rad p.R211H à l'échelle du cœur et de l'organisme entier, un modèle de souris Knock In a été généré (Clinique de la Souris, Strasbourg). Ce modèle porte le gène muté sur un allèle du gène Rad dont l'Histidine en position 210 correspondant à celle du gène humain en position 211 a été remplacée par une Arginine.

Plusieurs tests visant à étudier les propriétés cardiaques et les aspects structuraux du cœur de ces souris sont menés et comparés aux données relevés sur un groupe de souris contrôle issus des mêmes portées que celles qui portent le variant. Les groupes de souris constitués pour chaque génotype (WT et R210H) sont équilibrés en âge (un point a été fait à 15 et 30 semaines), en genre (5 femelles et 5 mâles du même âge pour chaque génotype) et en génotype (10 souris WT et 10 souris R210H par point d'âge).

7.1. Caractérisation électrophysiologique :

Des ECG à 6 dérivations sont effectués par l'insertion de sondes 25-gauge sous-cutanées à la naissance des 4 membres sur la face ventrale de la souris. L'administration d'une anesthésie à l'isoflurane est effectuée dont la concentration est d'abord réglée à 2% à l'induction pendant 2 à 3 minutes puis maintenue à 0.8-1% pendant l'enregistrement (Forene, AbottFrance Rungis, France). La souris est placée en décubitus dorsal sur un tapis chauffant aidant à maintenir sa température corporelle à 37°C, cette température est contrôlée à l'aide d'une sonde rectale (Harvard Appartus, USA). Un enregistrement en état basal est d'abord effectué pendant 2 minutes puis une administration d'Ajmaline (20mg/kg) par injection intrapéritonéale est faite et l'enregistrement se poursuit pendant 10 minutes. Les données d'ECG de surface sont relevées sur les 6 dérivations (D1, D2, D3, VI, VII, VIII) par le biais d'un amplificateur et d'un convertisseur numérique IOX 1.585 (EMKA technologies, Paris), le tout est relié à un ordinateur comprenant un logiciel d'acquisition et d'analyse (ECG auto, EMKA Technologies). Les analyses sont réalisées sur le même logiciel, trois complexes successifs sont utilisés pour mesurer la durée des ondes P, complexes QRS et des intervalles PR et QT en dérivation D1.

Les souris âgées de 30 semaines ont été soumises à une exploration endocavitaire du ventricule droit au niveau de sa chambre de chasse par cathétérisme endovasculaire. La sonde de stimulation et d'enregistrement introduite est reliée à un stimulateur et un amplificateur connectés à un ordinateur avec un logiciel de traitement de données (EMKA Technologies). Les cathéters multipolaires inclus dans la sonde permettent un recueil de l'activité électrique intracardiaque et l'analyse de sa propagation. Les protocoles de stimulation cardiaque ont été appliqués au niveau ventriculaire, permettant la détermination des périodes réfractaires aux différents étages et le déclenchement des tachycardies ainsi que d'étudier la conduction nodale rétrograde.

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) de Kétamine à une dose de 100 mg/kg (Imalgène 500, Merial, France) et de Xylasine à 20 mg/kg (Rompun 2%, Bayer Pharma, France). Un ECG de surface D1 est enregistré pendant 3 minutes à l'aide de deux électrodes sous-cutanées de calibre 25-gauge. Une analgésie est ensuite réalisée par injection sous cutanée de Nalbuphine (Nubain 3 µg/kg). Si nécessaire, une dose d'étomidate est ajoutée (10 mg/kg, voie IP). Une anesthésie locale par injection de xylocaine 1% (dose 40mg/kg) sous-

cutanée est réalisée à la droite du cou, et la veine jugulaire droite isolée. Une sonde octapolaire 2F (Cordis Webster®, USA) est introduite dans le cœur via cette veine.

L'électrocardiogramme de surface (dérivation D1) est enregistré avec deux électrodes sous-cutanées. La sonde d'exploration est alors, positionnée afin d'obtenir l'enregistrement du faisceau de His ainsi que l'ECG ventriculaire.

La stimulation ventriculaire programmée est réalisée avec un stimulateur UHS 20 Biotronik (Nantes) ou Matlab C++, 509 Stimulator, Grass Telefactor (ICM). Le seuil de stimulation, correspondant à l'énergie minimale entraînant une dépolarisation ventriculaire, est déterminé et les stimulations sont ensuite effectuées à une intensité une fois et demi supérieure à ce seuil. La durée d'impulsion est réglée à 1 ms puis la période réfractaire ventriculaire effective est déterminée. Les protocoles de stimulation utilisés sont calqués sur les protocoles validés en pratique clinique humaine, adaptés aux fréquences cardiaques des souris. Le protocole de stimulation comprends d'abord un train de 9 stimuli à 100 ms de couplage suivis de un extra-stimulus avec un intervalle de couplage décroissant progressivement par pas de 2 ms à partir de 100 ms jusqu'à obtention de la période réfractaire. Chaque stade est répété deux fois pour s'assurer de sa reproductibilité.

7.2. Etude de l'expression de la protéine Rad :

Sur ces mêmes groupes de souris, des quantifications de la protéine Rad est effectuée. Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et les cœurs sont extraits puis disséqués afin d'isoler les parois libres des ventricules gauche et droit et la chambre de chasse du VD est séparée. Ces échantillons sont disséqués dans du Tyrode froid (4°C) puis rapidement transférés dans de l'azote liquide le temps d'être placés à -80°C. Les tissus disséqués sont broyés et les protéines extraites et quantifiées comme décrit dans la section « quantification des protéines » page 67.

7.3. Caractérisation de la structure cardiaque :

L'effet du variant p.R211H de Rad sur la structure du cytosquelette des cardiomyocytes de souris néonatales et dérivés d'iPSC a aussi été étudié chez le modèle KI Rad R210H. Les cœurs de souris sauvages et KI R210H ont été extraits et rapidement canulés par l'aorte à l'aide d'un cathéter relié à un système de perfusion remplis de PFA 4%. Ce système permet une fixation des tissus plus homogène car le fixateur passe par les coronaires et suit le même trajet que le sang empreinte pour perfuser les parois cardiaques de l'intérieur.

Après 48h de fixation, les cœurs sont placés dans un automate (STP 120 Myr Microm Microtech) dans le but de les déshydrater dans des bains d'alcool croissants (80°-1h, 95°-1h, 95°-1h30, 95°-1h30, 100°-1h15, 100°-1h30, 100°-2h, butanol 2h, butanol 2h30, butanol 2h30) suivis de deux bains de paraffine en fusion (2h30 et 2h) dans lesquels les échantillons sont maintenus jusqu'au moment de l'inclusion. Les cœurs sont inclus dans des blocs de paraffine dans la position souhaitée pour obtenir des coupes de cœurs à 4 cavités (plan longitudinal) et sont déposés sur une plaque de refroidissement (-15°, EC 350-2 ; Myr) pendant 1h. Les cœurs sont conservés à 4°C pendant 24h avant utilisation.

Les coupes de cœurs d'une épaisseur de 5 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome (HM 355S Microm Microtech ; France), et les coupes obtenues sont placées par ruban de 3 coupes sur des lames (Starfrost Knittel Glass) puis la paraffine chauffée sur une plaque chauffante qui permet de lisser la paraffine et de la faire adhérer à la lame.

Les coupes sèchent à température ambiante pendant 1 à 2h avant l'étape de coloration. Les colorants utilisés étant en solution aqueuse, les coupes doivent passer par une étape de déshydratation avant d'être colorées. Pour ce faire, les lames sont placées pendant 5 minutes dans deux bains de Tissue Clear® (Sakura Finetek ; USA) afin d'éliminer la paraffine puis 1 minute dans des bains d'alcool croissants (100°, 95°, 80°, 70°) et l'étape de rinçage est faite dans de l'eau dé-ionisée.

Les anomalies de structure potentiellement induite par l'expression du variant Rad p.R210H dans les souris KI ont été étudiées grâce à une coloration Hématoxyline-Eosine. Cette coloration marque les noyaux des cellules en violet et les cytoplasmes en rose. Les lâmes sont placées 20 secondes dans l'Hématoxyline de Harris (DiaPath), rincées à l'eau dé-ionisée puis plongées pendant 30 secondes dans un bain d'éosine (DiaPath). Cette étape est suivie d'un autre rinçage puis d'une dernière étape de déshydratation.

La fibrose cardiaque a été étudiée au sein du myocarde des souris par le biais d'une coloration au rouge picrosirius qui colore spécifiquement les fibres de collagène. Le collagène étant une structure acidophile, l'acide picrique va s'y fixer de façon préférentielle et démarquer les filaments de fibrose du myocarde qui va prendre une teinte beaucoup moins soutenue après la coloration. Le lames sont placées 1h dans un bain de rouge picrosirius (1 g de rouge sirius, 20 g d'acide picrique pour 1L d'eau, PH 2.0), puis décolorées pendant 2

minutes dans un bain d'HCL 0.01N. Une étape de rinçage est effectuée à l'eau dé-ionisée avant une nouvelle étape de déshydratation.

Après cette seconde étape de déshydratation qui permet d'éliminer l'eau issue des colorations mais aussi de préserver les coupes dans le temps, les lames sont montées avec une lamelle à l'aide d'un liquide de montage spécifique (DPX-Mountant).

Les coupes sont observées au microscope droit classique (Eclipse E-600 Nikon, Japon) et les images sont acquises à l'aide du logiciel Nis-Element (v4.10 Nikon, Japon). Pour les mesures de fibrose cardiaque, seules les images acquises sur le ventricule droit ont été analysées et la quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji Win 64 (NIH Software).

Article principal

L'article principal de cette thèse englobe la majorité des travaux de caractérisation du variant RRAD p.R211H et des mécanismes par lesquels le phénotype décrit à l'échelle cellulaire pourrait s'expliquer. L'article commence par la présentation des données cliniques du propositus de la famille dans laquelle le variant a été identifié, suivies par le détail des investigations génétiques menées sur le propositus et les membres de sa famille incluant les filtres de sélectivité qui ont conduit au variant sélectionné : RRAD p.R211H. La protéine codée par le gène RRAD a fait l'objet d'une étude d'expression à l'échelle du cœur humain et murin afin d'étudier sa distribution tissulaire, puis des cardiomyocytes ont été dérivés du propositus portant le variant RRAd p.R211H et une caractérisation électrophysiologique et structurale a été effectuée sur ces cellules et les résultats obtenus ont été comparés à une lignée de cardiomyocytes dérivée d'un contrôle intrafamilial. Le phénotype observé a ensuite été confirmé dans des cardiomyocytes de souris nouveau-nées dans lesquelles la protéine Rad WT et Rad R211H ont été exprimées.

RRAD mutation causes electrical and cytoskeletal defects in cardiomyocytes derived from a familial case of Brugada syndrome

Nadjet BELBACHIR, MSc,[a*] Vincent PORTERO, PhD,[a*] Jean-Baptiste GOURRAUD, MD, PhD,[ab] Laurence JESEL, MD,[c] Nathalie GABORIT, PhD,[a] Christophe GUILLUY, PhD,[d] Aurore GIRARDEAU, BSc,[a] Stephanie BONNAUD, PhD,[a] Floriane SIMONET, MSc,[ab] Matilde KARAKACHOFF, MSc,[ab] Sabine PATTIER, MD,[b] Carol SCOTT, MSc,[e] Sophie BUREL, PhD,[a] Céline MARIONNEAU, PhD,[a] Caroline CHARIAU, BSc,[f] Anne GAIGNERIE, MSc,[f] Aurélie THOLLET, PhD,[b] Emmanuelle GENIN, PhD,[g] Jean-François DELEUZE, PhD,[h] Christian DINA, PhD,[ab] Isabelle BARÓ, PhD,[a] Jean-Jacques SCHOTT, PhD,[ab] Vincent PROBST, MD, PhD,[ab] Richard REDON, PhD,[ab#] Flavien CHARPENTIER, PhD,[ab#] Solena LE SCOUARNEC, PhD[a#]

[a] INSERM, CNRS, UNIV Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France
[b] CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de Cardiologie, Nantes, France
[c] CHU Strasbourg, Service de Cardiologie, Strasbourg, France
[d] Institute for Advanced Biosciences, INSERM, CNRS, Grenoble, France
[e] The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK
[f] INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, SFR François Bonamy, iPSC core facility, Nantes, France
[g] Inserm UMR-1078, CHRU Brest, Univ. Brest, Brest, France
[h] Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Institut de Génomique, CEA, Evry, France.

* Same contribution as first author.
\# Same contribution as last author.

Short title: *RRAD* mutation and Brugada syndrome (35 characters; max allowed: 45)

Total word Count: 5600 max 5000 words without title and abstract pages

Disclosures:
The authors have reported that they have no relationships with industry relevant to the contents of this paper to disclose.

Funding:
This work was funded by the *Fondation pour la Recherche Médicale* (Equipe FRM DEQ20140329545 to JJS), the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-12-BSC1-0013-01 to FC, ANR-14-CE10-0001-01 to RR, ANR-15-CE14-0019-01 to NG, ANR-15-CE14-0006-01 to CM), the *Fédération Française de Cardiologie* (FFC R15070NN to NG) and the *Pays-de-la-Loire* regional council (VaCaRMe program to RR).

Reprint requests and correspondence:
Solena LE SCOUARNEC, PhD
l'institut du thorax
Inserm UMR S1087, CNRS UMR C6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
E-mail: solena.lescouarnec@univ-nantes.fr

Flavien CHARPENTIER, PhD
l'institut du thorax
Inserm UMR S1087, CNRS UMR C6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
E-mail: flavien.charpentier@univ-nantes.fr

Acknowledgements:

The authors thank Virginie Forest and Agnès Carcouet (*l'institut du thorax*) for their expert technical assistance, as well as the members of the *Centre d'Investigation Clinique* and the *Centre de Référence des Arythmies Cardiaques* and the *Centre de Ressources Biologiques* at the CHU of Nantes. Genomic analysis, confocal imaging experiments and neonatal mouse cardiomyocytes isolation and culture were performed with the support of the *GenoBIRD*, *MicroPiCell* and *Therassay* core facilities (Biogenouest), respectively. Finally, the authors are grateful to the patients and families who agreed to participate in our research.

Abstract (250 words; max allowed: 250)

Background. The Brugada syndrome (BrS) is an inherited cardiac disorder predisposing to ventricular arrhythmias. Despite considerable efforts in the past decade, the genetic basis and cellular mechanism of this disease remains largely unknown.

Objectives. The objective of the present study was to identify a new susceptibility gene for BrS though familial investigation.

Methods. An approach based on whole-exome sequencing was applied to a large pedigree with five affected members. After gene prioritization, the variant of interest was subjected to electrophysiological and structural investigations in human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) and in mouse neonatal cardiomyocytes.

Results. We identified one rare substitution (p.R211H) in the RAD GTPase carried by all affected members of the family and then found 3 additional rare substitutions in RAD among 186 unrelated index cases. We detected higher levels of the RAD transcript in subepicardium than in subendocardium in human heart, as well as predominant expression of Rad in the right ventricle outflow tract compared to the other cardiac compartments in mice. iPSC-CMs from the index case exhibited reduced action potential upstroke velocity, prolonged action potentials and increased incidence of early afterdepolarizations, with decreased amplitude of peak Na^+ and L-type Ca^{2+} currents and increased amplitude of Na^+ persistent current compared with those from his healthy brother. These cells showed cortical distribution of actin, cell rounding and reduced focal adhesion count.

Conclusions. Mutation in the RAD GTPase recapitulate the classical electrophysiological signature of Brugada syndrome coupled with cytoskeleton disturbances in cardiomyocytes derived from the patient.

Keywords: Brugada Syndrome, Rad GTPase, induiced Pluripotent Stem Cells, Sodium current, L type Calcium current, Actin cytoskeleton

Abbreviations and acronyms:

Introduction

The Brugada syndrome (BrS) is a rare inherited disorder characterized by a specific but labile pattern at the electrocardiogram (ECG), *i.e.*, a coved ST-segment elevation ended by a negative T-wave in the right precordial leads, revealing electrical dysfunctions that predispose to ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (SCD)[1]. Despite numerous studies over the last 25 years, the molecular basis for the ECG abnormalities and the mechanism underlying ventricular arrhythmias and SCD in the context of BrS are still incompletely understood.

Mutations in the *SCN5A* gene, which encodes the main cardiac Na^+ channel α-subunit Nav1.5, have been found in 20-25% of BrS probands.[2 3 4]. These mutations result in a reduction of the cardiac Na^+ current (I_{Na}) and are thought to decrease rapid cardiomyocyte depolarization and cardiac conduction, a mechanism that may play a key role in BrS pathogenesis.[5]. Other rare variants have been reported as predisposing to BrS, affecting more than 20 genes encoding proteins either involved in Nav1.5 regulation, or encoding L-type Ca^{2+} channel subunits and K^+ channels subunits mainly involved in $I_{K,ATP}$ and I_{to} generation.[6,7]. However, these additional variants can explain altogether less than 5% of cases. Overall, molecular diagnosis can resolve only 25-30% of cases.

Apart from *SCN5A*, the genes associated with BrS susceptibility have been identified only in few unrelated patients or in small families through candidate gene approaches: there is increasing evidence that they may play only a minor role, if any, in the phenotype of the patients.[8 9 10]. Moreover, extended familial genetic investigations revealed numerous occurrences of phenocopies and non-penetrance for the identified familial *SCN5A* variants in families affected by BrS, questioning the autosomal dominant transmission pattern initially proposed.[11]. Recently, the identification of 3 risk loci for BrS by genome-wide association study confirmed a more complex pattern of disease transmission.[12]. Despite this genetic complexity, studies on familial cases remain useful to discover new genes involved in disease susceptibility

and understand better the pathogenesis of BrS.

In the present study, by applying an approach based on whole-exome sequencing to a large pedigree with BrS and documented history of SCD, we identified a rare non-synonymous variant (p.R211H) in the gene encoding the RAD (Ras Associated with Diabetes) GTPase[13]. We then demonstrated RAD involvement in BrS pathogenesis, based on functional studies in cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) obtained from the family proband and his unaffected brother, as well as neonatal mouse cardiomyocytes with adenoviral-mediated expression of wild-type and p.R211H RAD transcripts.

Methods

All the experimental procedures performed in the context of this study are available in detail in the online data supplement.

Results

Clinical report: a familial case of Brugada syndrome

The index case (individual III:2; Figure 1), a 41-year-old man, was first diagnosed after a systematic ECG. He presented a typical but labile BrS type I ECG pattern (Figure 1A). He mentioned that he had previously experienced palpitations associated with near syncope and nocturnal agonal respiration. After ICD implantation, neither recurrent symptoms nor ventricular arrhythmias have been observed. During familial screening, 4 relatives were identified as affected after flecainide challenge (Figure 1B). In addition, individual III:8 exhibited a BrS type II ECG pattern under flecainide (online supplemental Figure 1). None of these individuals had presented relevant symptoms. However, an unexplained sudden death occurred at rest in a 41-year-old proband's uncle (individual II:3). ECG and clinical parameters for this French family are provided in Table 1.

Identification of a rare *RRAD* variant in a familial case of BrS

Whole-exome sequencing on the index case unveiled 217 rare coding variants (online supplemental Methods). After analyzing variants located in genomic regions shared by all affected family members and co-segregation analyses, 6 missense variants were detected in all 5 affected patients (Figure 1C). They were located in *RRAD* and *FHOD1* on chromosome 16, *H6PD* on chromosome 1, and *SNAP23* and *SPTBN5* (two variants) on chromosome 15 (online supplemental Table 1). While there were 6 non-affected carriers for each variant on chromosomes 1 and 15, both variants located on chromosome 16 (in *RRAD* and *FHOD1*) were carried by only 3 non-affected relatives (online supplemental Table 1; Figure 1B): the individual III:8 presenting with a BrS type-II ECG pattern, and two women (II:2 and III:4) for whom drug challenge could not be performed. Furthermore, among the 6 missense variants, the *RRAD* variant (p.Arg211His) was the only one predicted to be damaging by SIFT and

PolyPhen-2. This variant is also associated to the highest CADD score, and is currently reported as the least frequent in the gnomAD database (1/242,446 alleles, see online supplemental Table 1). By screening the 4 coding exons of *RRAD* in 186 unrelated BrS patients using Sanger sequencing, we identified three additional rare missense mutations in isolated cases: p.Asp46Tyr, p.Gln186Arg and p.Val215Met (online supplemental Table 2). Overall, we detected a trend for enrichment (p=0.037, OR=8.77, 95% CI: 0.86-433.8) in rare non-synonymous variants (with an MAF below 0.1% in gnomAD) among the BrS cases (4 carriers out of 187 cases) compared to a population of 404 reference individuals of French origin, for which *RRAD* genotype status was available in-house (1 carrier out of 404 individuals, see online supplemental Table 2).

Since BrS is characterized by abnormal electrical activity in the right ventricle outflow track (RVOT) region, we compared Rad expression levels in mouse RVOT to its expression in the rest of the right ventricle and the left ventricle. As shown in Figure 2A, Rad was 4-fold more expressed in the RVOT than in the other ventricular parts. We also investigated the expression of RAD in human left and right ventricles and observed higher RAD expression in the subepicardium than in the subendocardium for both compartments (Figure 2B).

In order to decipher the electrophysiological consequences of the missense variant in *RRAD* (and/or possibly in *FHOD1)* within the family, we differentiated cardiomyocytes from iPSCs obtained from the index case (BrS; individual III:2) and his unaffected brother (Ctl; individual III.1) who carries the rare variants on chromosomes 1 and 15 but not on chromosome 16. As described in details in the online data supplement, cardiomyocytes were differentiated from 2 and 3 iPSC clones obtained, respectively, from the Ctl and BrS individuals.

Slow rate, reduced action potential upstroke velocity, prolonged action potential duration and early afterdepolarizations in BrS iPSC-CMs

We first investigated the properties of the iPSC-CMs ventricular-like action potentials. BrS iPSC-CMs displayed slower spontaneous rhythms than Ctl iPSC-CMs and lower action potential upstroke velocity (Figure 3A-C). When paced at a cycle length of 700 ms, BrS iPSC-CMs showed longer action potentials than Ctl iPSC-CMs (Figure 3D-E). For these parameters, no significant difference was observed between the three BrS iPSC-CM clones and between the two Ctl iPSC-CM clones (online supplemental Figure 2). Early afterdepolarizations (EADs) were observed in 80% and 50% of BrS iPSC-CMs derived from BrS01 and BrS03 clones, respectively (Figure 3F-G). No EAD was observed in Ctl iPSC-CMs and in BrS iPSC-CMs derived from clone BrS02. Based on these results, we investigated the biophysical properties of the Na^+ and L-type Ca^{2+} currents of iPSC-CMs.

I_{Na} and $I_{Ca,L}$ disruption in BrS iPSC-CMs

Membrane capacitance in BrS iPSC-CMs was slightly, though not significantly, higher (55.5±3.1 pF, n=68) than in Ctl iPSC-CMs (47.5±3.2 pF; n=51; p=0.07). As shown in Figure 4A-B, I_{Na} density was significantly lower (by ~40% at -20 mV) in BrS iPSC-CMs than in Ctl iPSC-CMs. Steady-state activation and inactivation gating properties as well as the inactivation kinetics at -20 mV did not differ between BrS and Ctl iPSC-CMs (Table 2). However, the recovery from inactivation at -120 mV was faster in BrS iPSC-CMs than in Ctl iPSC-CMs (Figure 4C). I_{CaL} density was also lower (by ~30% at 0 mV) in BrS iPSC-CMs compared to Ctl iPSC-CMs without any disturbance of steady-state activation gating properties (Figure 4D-E; Table 2). No difference in I_{Na} and I_{CaL} densities between the three BrS iPSC-CM clones and between the two Ctl iPSC-CM clones was observed (online supplemental Figure 4). Interestingly, BrS iPSC-CMs also exhibited a much larger persistent Na^+ current (-3.2 ± 0.3 pA/pF, n = 37) than Ctl iPSC-CMs (-0.2 ±0.1 pA/pF, n = 7; Figure 4F-G).

Cytoskeleton defects in BrS iPSC-CMs

The BrS iPSC-CMs displayed impaired F-actin organization and cortical distribution of Troponin I while Ctl iPSC-CMs displayed a striated distribution of both proteins. This cytoskeleton defect was observed in 70% of BrS iPSC-CMs whereas only 8% of Ctl iPSC-CMs displayed similar defects (Figure 5A). Three-dimensional views of BrS iPSC-CMs and Ctl iPSC-CMs using confocal microscopy showed that Ctl iPSC-CMs had flat cell bodies, whereas BrS iPSC -CMs exhibited round cell shape making the cell thickness larger than in Ctl iPSC-CMs (Figure 5B). In addition, the density of vinculin-containing focal adhesion complexes was lower in BrS iPSC-CMs than in Ctl iPSC-CMs, with impaired localization of vinculin (online supplemental Figure 5).

Human RAD GTPase overexpression in neonatal mouse cardiomyocytes recapitulates BrS iPSC-CMs phenotype

In order to check whether the *RRAD* p.R211H variant was indeed responsible for both electrical and cytoskeletal anomalies, we investigated the effects of an adenoviral expression of either GFP alone (ad_GFP), wildtype human RAD plus GFP (ad_WT-RAD), or p.R211H-RAD plus GFP (ad_R211H-RAD), in neonatal mouse cardiomyocytes in primary culture. Ad_WT-RAD cells exhibited a lower I_{Na} density (by ~40% at -20 mV) than ad_GFP cells (Figure 6A-B; Table 3) and a shift of I_{Na} steady-state activation curve toward more positive potentials (Figure 6C). Membrane capacitance did not significantly differ between the two groups: 35.5 ± 3.8 pF in ad_GFP cells (n = 15) and 26.7 ± 2.1 pF in ad_WT-RAD cells (n = 18). Adenoviral expression of p.R211H-RAD had a non significant additional effect on I_{Na} (online supplemental figure 8). Ad_WT-RAD cells also showed a lower $I_{Ca,L}$ density (by ~70% at 0 mV) than ad_GFP cells without significant alterations of the channel gating properties (Figure 6D-E-F; Table 3). Ad_R211H-RAD cells did not show lower $I_{Ca,L}$ density than ad_WT-RAD cells (data not shown). Furthermore, ad_R211H-RAD cells exhibited similar alterations

in F-actin organization and cell shape abnormalities as observed in BrS iPSC-CMs (online supplemental Figure 6). In addition, Rho kinase activity was lower in ad_R211H-RAD cardiomyocytes than in Ad_WT-RAD and ad_GFP cells, while its expression was not altered (online supplemental Figure 7).

Discussion

In this study, we identified a novel BrS-susceptibility gene, *RRAD*, and showed that the *RRAD* variant identified in a familial case of the disease leads to BrS-typical electrical defects (*i.e.*, reduced amplitude of I_{Na} and $I_{Ca,L}$,), coupled with cardiomyocyte cytoskeletal abnormalities that, to the best of our knowledge, had never been reported in the context of this arrhythmia disorder.

In the past two decades, the BrS has been associated to more than 20 susceptibility genes. [2 3 4 14]. Most of those genes, including SCN5A, have been identified using functional candidate approaches, with only few mutations co-segregating with Brugada ECG anomalies in familial cases. In the present study, we applied a hypothesis-free approach, based on whole-exome sequencing and identity-by-descent analysis, to a familial case with genetically unexplained Brugada syndrome. Following this strategy, we could identify 6 missense variants shared by the 5 family members exhibiting the BrS phenotype. Among these variants, the p.R211H missense substitution in the *RRAD* gene was (i) the least frequent in public databases (reported in only one case), (ii) the only variant predicted as deleterious by both SIFT and Polyphen-2, and (iii) the variant with the highest CADD score. These results indicate that p.R211H is the most likely causal variant in this familial case, independently to the biological function of *RRAD*.

We then tested the relative contribution of *RRAD* in BrS susceptibility by screening for rare non-synonymous variants within its sequence among unrelated index cases compared to 404 reference individuals, all of French origin. We could observe a trend for enrichment in rare non-synonymous variants among cases ($p<0.05$) - with three affected individuals carrying rare missense mutations versus only one reference individual – thus confirming the likely involvement of *RRAD* in BrS pathophysiology.

RRAD encodes the RAD (for Ras Associated with Diabetes) protein, a member of the

RGK subfamily of Ras GTPases that has previously been associated with ventricular arrhythmias in mice[15]. Here we showed higher levels of the RAD transcript in subepicardium than in subendocardium in human heart, as well as predominant expression of Rad in the right ventricle outflow tract compared to the other cardiac compartments in mice: both expression patterns are fully concordant with a role in BrS pathogenesis.

RAD has previously been shown to negatively regulate the cardiac L-type Ca^{2+} current. On one hand, overexpression of Rad in rat cardiomyocytes was shown to dramatically reduces $I_{Ca,L}$,[16]. On the other hand, a dominant negative suppression of RAD was shown to up-regulate Cav1.2 expression at the membrane.[15.] Here we showed that the *RRAD* p.R211H variant leads to a reduction of the L-type Ca^{2+} current amplitude, indicating that *RRAD* p.R211H variant acts as a gain-of-function mutation.

The arginine-211 residue is highly conserved among species and among the RGK protein members. It is localized between the G4 and the G5 sites of the RAD guanine recognition area located in the G domain and may play an important role on RAD affinity for the GTP.[17,18]. Because of the 3 dimensional folding of the protein, the arginine 211 is also close to the Cavβ binding site. Its substitution by a histidine might lead to an increased interaction of RAD with Cavβ2 subunit, thus preventing its interaction with Cav1.2 and reducing its traffic to the sarcolemma. [18,19,20].

Results obtained with iPSC-CMs also demonstrate that the *RRAD* p.R211H variant reduces I_{Na} by about 40%. To our knowledge, this the first report of an effect of RAD on the cardiac Na^+ channel. As for $I_{Ca,L}$, p.R211H variant seems to lead to a gain of function of RAD, since its effect on I_{Na} in iPSC-CMs is mimicked by an overexpression of wild-type RAD in neonatal mouse cardiomyocytes. Whether RAD interacts directly with Nav1.5 or with one of its numerous regulatory subunits[21] remains an open question: further studies will be necessary to elucidate the mechanisms leading the Nav1.5 loss-of-function.

The iPSC-CMs of the mutated patient were also characterized by the presence of a large persistent Na^+ current and the occurrence of EADs. At first glance, this type of arrhythmic mechanism is not expected to be involved in arrhythmias in the context of BrS. However, EADs have also been observed in iPSC-CMs from a BrS patient with a *TBX5* gene variant[22], as well as in iPSC-CMs of BrS patients carrying *SCN5A* mutations[23]. In this latter study, those arrhythmic events were linked to abnormal Ca^{2+} handling, which also led to delayed afterdepolarizations. These phenotypic traits seem to be characteristic of BrS in iPSC-CMs: their involvement in triggering arrhythmias in the patient remains uncertain.

The effect of *RRAD* p.R211H on the L-type Ca^{2+} current amplitude mimics those of Cav1.2 and Cavβ2 loss-of function variants, which were previously reported to cause a peculiar form of BrS associated with short QT interval[14]. Conversely, *RRAD* p.R211H decreases the amplitude of the Na^+ peak current and leads to the occurrence of a Na^+ persistent current. These effects are similar to those produced by the *SCN5A* mutation p.1795insD, which causes an overlap syndrome combining the phenotypic traits of BrS and type 3 long QT syndrome[24]. Here, the *RRAD* p.R211H carriers exhibit normal QT intervals, suggesting that the relative effects of this variant on the L-type Ca^{2+} and persistent Na^+ currents may compensate each other.

In addition to the electrical defects, *RRAD* p.R211H dramatically reduces the striated architecture of the cardiomyocyte cytoskeleton, combined with impaired localization of focal adhesions and cell rounding. Again here, the mutation leads to RAD gain-of-function, since overexpression of the wild-type form of RAD induces similar effects in neonatal cardiomyocytes. RAD is known to interact with cytoskeleton[25,26]. Its overexpression was previously shown to inhibit breast cancer cell invasion[27], smooth muscle cell migration after vascular lesion[28] or dendrite elongation during neuronal development[29]. In the present study, *RRAD* p.R211H acts like a down-regulator of the F-actin cytoskeleton - most likely through the inhibition of Rho Kinase activity (online supplemental Figure 7) [29].These structural defects

induced by RAD p.R211H might lead to decreased cell-to-cell connection and abnormal cardiac conduction[30] and thus play a role in BrS.

There is accumulating evidence that structural anomalies in the myocardium, such as fatty infiltrations and fibrosis, may trigger electrical anomalies in relation to BrS [31,32,33] Furthermore, several susceptibility genes or loci, such as *MOG1*[34]or *HEY2,*[12] have been shown to regulate both cardiac morphogenesis and electrical activity[35,36,37]. Taken together, these data indicate that structural ventricular anomalies may contribute significantly to the expression of the electrical features typical of BrS.

In conclusion, our results recapitulate many aspects of BrS pathogenesis. RAD gain-of function reduces the amplitude of both the L-type Ca^{2+} and the Na^{+} currents and induces a persistent Na^{+} current. These 3 electrical effects had previously been observed in the context of BrS. In addition, this variant leads to cytoskeleton anomalies and defaults in cell morphology. This impaired structural integrity of cardiomyocytes, which had never been related to BrS, might alter conduction by destabilizing myocardial structure. The relative contribution of myocardial structural abnormalities versus electrical alterations remains uncertain, and should be subjected to further investigations.

Perspectives

Competency in medical knowledge: RAD GTPase dysfunction leads to both electrical and morphological anomalies in cardiomyocytes derived from a patient with BrS.

Translational outlook: Further studies are needed to assess RAD function in the context of Brugada syndrome and the potential therapeutic implications of modulating RAD activity.

Figure legends

Central illustration. *RRAD* gene is involved in Brugada syndrome (BrS). In this study, a variant was identified in the gene encoding RAD GTPase (p.R211H RAD) in a familial case of BrS. Functional studies in cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) of family members and in neonatal mouse cardiomyocytes (NMC) overexpressing human RAD showed that the variant leads to electrical and structural abnormalities. RAD is preferentially expressed in the right ventricular outflow tract (RVOT). Altogether, these results confirm the involvement of RAD in BrS. Abbreviations: RV, right ventricle; LV, left ventricle; I_{Na}: sodium current. I_{CaL}: L-type calcium current. $Na_V1.5$: pore-forming sodium channel subunit. $Ca_V1.2$: pore-forming calcium channel subunit; APD, action potential duration; EAD, early afterdepolarization; ECM, extracellular matrix.

Figure 1. Electrocardiographic pattern and genetic investigation in a family with Brugada syndrome. A. DII peripheral lead and V1-V6 precordial leads of the proband under baseline condition. **B.** Family pedigree. SD: sudden death. The arrow indicates the proband. ECGs were recorded in 14 individuals, under baseline conditions only for 3 individuals (II.1, II.2 and III.4), or under baseline conditions and during flecainide challenge for 11 individuals. DNA was collected for 14 individuals. **C.** Exome filters**.** * SO terms (VEP): stop_gained, stop_lost, frameshift_variant, missense_variant, splice_donor_variant, splice_acceptor_variant, initiator_codon_variant, inframe_insertion, inframe_deletion, splice_region_variant, synonymous_variant, stop_retained_variant**.** ** SO terms (VEP): stop_gained, stop_lost, frameshift_variant, missense_variant, splice_donor_variant, splice_acceptor_variant, initiator_codon_variant, inframe_insertion, inframe_deletion**.** *** MAF < 0.1% in all ExAC populations.

Figure 2. Rad protein expression pattern in human and mouse hearts. A. Top. Representative western blot of mouse Rad expression in the left ventricular free wall (LV), the

right ventricular free wall (without outflow tract; RV) and the right ventricular outflow tract (RVOT) from one mouse. Bottom. Corresponding mean±sem Rad expression normalized to stain free (SF) for 9 mice. ***p<0.001 *vs*. LV and RV (Kruskal-Wallis rank sum test). **B.** Top. Representative western blot of RAD expression in left (LV) and right (RV) ventricular transmural samples (M), subendocardial samples (End) and subepicardial samples (Epi) from one individual. Bottom. Corresponding mean±sem RAD expression normalized to stain free (SF) for 3 individuals. *p<0.05, **p<0.01 (Mann-Whitney rank sum test).

Figure 3. Action potentials in cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). **A**. Representative action potential recordings of spontaneously beating Ctl and BrS iPSC-CMs. **B-C**. Box plots of cycle length (B; spontaneous CL) and maximum upstroke velocity (C; dV/dT_{max}) of spontaneous action potentials. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Kruskal-Wallis rand sum test). **D**. Representative action potentials recorded at a pacing cycle length of 700 ms in Ctl and BrS iPSC-CMs. **E.** Mean action potential duration at 30% (APD_{30}), 50% (APD_{50}) and 90% (APD90) of full repolarization. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (two-way analysis of variance with Bonferonni post-hoc test for multiple comparisons). **F.** Representative examples of early afterdepolarizations (EADs) recorded in spontaneously beating cardiomyocytes differentiated from BrS01 and BrS03 iPSC clones. **G.** EAD incidence in the different iPSC-CM lines. ***p<0.001 (Khi^2 test).

Figure 4. I_{Na} and $I_{Ca,L}$ in iPSC-CMs obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). A, D. Superimposed representative I_{Na} (A) and $I_{Ca,L}$ (D) traces recorded in Ctl and BrS iPSC-CMs (voltage-clamp protocols in insets). **B, E.** Mean current density-membrane potential relationship for I_{Na} (B) and $I_{Ca,L}$ (E) recorded in Ctl and BrS iPSC-CMs. **C.** Mean time-course of recovery from inactivation in Ctl and BrS iPSC-CMs. The data are mean current amplitude normalized to maximal current amplitude (voltage-clamp protocol

in inset). The curves are fits of the data with double-exponential functions. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (two-way analysis of variance with Bonferonni post-hoc test for multiple comparisons). **F.** Representative currents recorded during 1-sec voltage-clamp ramps from -120 mV to +40 mV (inset) before (Control) and after tetrodotoxin (TTX) perfusion (top traces) in Ctl and BrS iPSC-CMs. Bottom traces show the corresponding TTX-sensitive currents. **G.** Box plot of the TTX-sensitive persistent Na^+ current (I_{NaP}) at -20 mV. **p<0.01, ***p<0.0001 (Kruskal-Wallis rank sum test).

Figure 5. Cytoskeleton in iPSC-CMs obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). A. Representative immunostainings of filamentous actin (F-actin; stained with phalloidin) and troponin I and merged acquisitions with nucleus staining with DAPI in Ctl and BrS iPSC-CMs (top panels) and corresponding fluorescence distribution measured at the level of the yellow dotted lines (fluorescence-distance relationships; bottom panels). Scale bars: 20 µm. **B.** Percentage of Ctl (n=10) and BrS (n=18) iPSC-CMs with striated (in white) and cortical (in black) F-actin staining. ***p<0.001 (Fisher exact test). **C.** Representative three-dimensional acquisition illustrations of a Ctl and a BrS iPSC-CM after immunostaining of F-actin and Troponin I (left panels). Width: 107.12 µm; height: 12 µm; Depth: 107.12 µm. Right panel: box plots of thickness and cell circularity (cell width/cell length ratio) in Ctl (n=10) and BrS (n=12) iPSC-CMs. **p<0.01, ***p<0.001 (Mann Whitney rank sum test).

Figure 6. $I_{Ca,L}$ and I_{Na} in neonatal mouse cardiomyocytes transduced with adenoviruses encoding Green Fluorescence Protein alone (ad_GFP) or wildtype human RAD plus GFP (ad_WT-RAD). A, D. Superimposed representative I_{Na} (A) and $I_{Ca,L}$ (D) traces from ad_GFP and ad_WT-RAD cardiomyocytes. Voltage-clamp protocols are shown in insets. **B, E.** Current density-membrane voltage relationship of I_{Na} (B) and $I_{Ca,L}$ (E) recorded in ad_GFP and ad_WT-RAD cardiomyocytes. **C, F.** Conductance-membrane voltage

relationships for I_{Na} (C) and $I_{Ca,L}$ (F) recorded in ad_GFP and ad_WT-RAD cardiomyocytes. The data are mean conductance normalized to maximal conductance (same protocols as in A and D). Curves are fits of the data with Boltzmann equations. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (two-way analysis of variance with Bonferonni post-hoc test for multiple comparisons).

References

1. Brugada P, Brugada J. 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;20:1391-1396.
2. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, 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;7:33-46.
3. Crotti L, Marcou CA, Tester DJ, et al. Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- Through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for brugada syndrome genetic testing: Implications for genetic testing. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:1410-1418.
4. Andorin A, Behr ER, Denjoy I, et al. Impact of clinical and genetic findings on the management of young patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2016;13:1274-1282.
5. Postema PG, van Dessel PFHM, Kors JA, et al. Local Depolarization Abnormalities Are the Dominant Pathophysiologic Mechanism for Type 1 Electrocardiogram in Brugada Syndrome. A Study of Electrocardiograms, Vectorcardiograms, and Body Surface Potential Maps During Ajmaline Provocation. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:789-797.
6. Gourraud J-B, Barc J, Thollet A, et al. The Brugada Syndrome: A Rare Arrhythmia Disorder with Complex Inheritance. *Front Cardiovasc Med*. 2016;3:1-11.
7. Portero V, Le Scouarnec S, Es-Salah-Lamoureux Z, et al. Dysfunction of the voltage-gated K^+ channel β_2 subunit in a familial case of Brugada syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e003122.
8. Risgaard B, Jabbari R, Refsgaard L, et al. High prevalence of genetic variants previously associated with brugada syndrome in new exome data. *Clin Genet*. 2013;84:489-495.

9. Le Scouarnec S, Karakachoff M, Gourraud JB, et al. Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for brugada syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015;24:2757-2763.

10. Ackerman MJ. Genetic purgatory and the cardiac channelopathies: Exposing the variants of uncertain/unknown significance issue. *Heart Rhythm*. 2015;12:2325-2331.

11. Probst V, Wilde AAM, Barc J, et al. SCN5A Mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2:552-557.

12. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, et al. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet*. 2013;45:1044-1049.

13. Reynet C, Kahn CR. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science*. 1993;262:1441-1444.

14. Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, et al. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 2007;115:442-449.

15. Yada H, Murata M, Shimoda K, et al. Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type Ca^{2+} channels in the heart. *Circ Res* 2007;101:69-77.

16. Wang G, Zhu X, Xie W, et al. Rad as a novel regulator of excitation-contraction coupling and β-adrenergic signaling in heart. *Circ Res*. 2010;106:317-327.

17. Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. J Cell Biol. 2012;196:189-201.

18. Yang T, Colecraft HM. Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK

proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2013;1828:1644-1654.

19. Finlin BS, Crump SM, Satin J, Andres DA. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14469-74.

20. Béguin P, Ng YJA, Krause C, Mahalakshmi RN, Mei YN, Hunziker W. RGK small GTP-binding proteins interact with the nucleotide kinase domain of Ca^{2+}-channel β-subunits via an uncommon effector binding domain. *J Biol Chem*. 2007;282:11509-11520.

21. Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. Cardiovasc Res. 2012;93:12-23.

22. Bersell KR, et al. Genomic editing in iPSCs establishes that a rare TBX5 variant causes Brugada Syndrome. *Heart Rhythm* 2016;13(5)Suppl:S9.

23. Liang P, Sallam K, Wu H, et al. Patient-specific and genome-edited induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes elucidate single cell phenotype of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2086-2096.

24. Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, et al. Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation*. 2006;114:2584-2594.

25 Zhu J, Bilan PJ, Moyers JS, Antonetti DA, Kahn CR. Rad, a novel Ras-related GTPase, interacts with skeletal muscle beta-tropomyosin. *J Biol Chem*. 1996;271:768-773.

26. Bilan PJ, Moyers JS, Kahn CR. The ras-related protein rad associates with the cytoskeleton in a non-lipid-dependent manner. *Exp Cell Res*. 1998;242:391-400.

27. Tseng Y, Vicent D, Zhu J, Niu Y. Regulation of growth and tumorigenicity of breast cancer cells by the low molecular weight GTPase Rad and nm23. *Cancer Res*. 2001;25:2071-2079.

28. Fu M, Zhang J, Tseng Y-H, et al. Rad GTPase attenuates vascular lesion formation by

inhibition of vascular smooth muscle cell migration. *Circulation*. 2005;111:1071-1077.

29. Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, et al. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol*. 2002;157:291-302.
30. Kant S, Holthöfer B, Magin TM, Krusche CA, Leube RE. Desmoglein 2-Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:553-563.
31. Catalano O, Antonaci S, Moro G, et al. Magnetic resonance investigations in Brugada syndrome reveal unexpectedly high rate of structural abnormalities. *Eur Heart J*. 2009;30:2241-2248.
32. Nademanee K, Raju H, de Noronha S V., et al. Fibrosis, Connexin-43, and Conduction Abnormalities in the Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(18):1976-1986..
33. Sieira J, Dendramis G, Brugada P. Pathogenesis and management of Brugada syndrome. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:744-756.
34. Kattygnarath D, Maugenre S, Neyroud N, et al. MOG1: A New Susceptibility Gene for Brugada Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:261-268.
35. Zhou J, Wang L, Zuo M, et al. Cardiac sodium channel regulator MOG1 regulates cardiac morphogenesis and rhythm. *Sci Rep*. 2016;6:21538.
36. Sakata Y, Kamei CN, Nakagami H, Bronson R, Liao JK, Chin MT. Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16197-16202.
37. Veerman CC, Podliesna S, Tadros R, et al. The Brugada Syndrome Susceptibility Gene HEY2 Modulates Cardiac Transmural Ion Channel Patterning and Electrical Heterogeneity. *Circ Res*. 2017;121:537-548.

Tables

Table 1. ECG and clinical parameters of the family members

Family members	*Chr16 haplotype*	Type I ECG pattern	Baseline						Flecainide					
			RR (ms)	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QTc (ms)	TPE (ms)	RR (ms)	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QTc (ms)	TPE (ms)
III:2	yes	spontaneous	828	98	165	100	410	72	-	-	-	-	-	-
III:5	yes	drug-induced	942	90	139	97	410	59	955	87	160	104	438	67
III:6	yes	drug-induced	1015	76	145	133	426	67	949	72	144	149	447	72
III:7	yes	drug-induced	711	108	152	118	395	67	872	106	196	127	402	66
III:8	yes	no*	724	81	152	91	375	22	755	95	196	95	385	51
IV:2	yes	drug-induced	617	83	122	88	409	64	649	87	157	116	464	52
II:5	no	no	882	117	200	101	424	69	829	109	217	113	427	68
III:1	no	no	1262	112	204	89	339	55	986	115	206	119	407	63
III:9	no	no	832	82	158	89	394	61	849	103	206	99	439	100
III:10	no	no	938	93	166	91	358	52	942	100	204	90	385	59
III:11	no	no	928	97	177	104	397	73	867	111	221	107	405	70
IV:1	no	no	897	93	148	87	375	62	679	103	162	103	446	118

Abbreviations: P, P wave; PR, PR interval; QRS, QRS complex, QTc, corrected QT interval; TPE, time interval between the peak and the end of the T wave. *, type II ECG pattern under flecainide (see online supplemental figure 1)

Table 2. Biophysical properties of I_{Na} and $I_{Ca,L}$ recorded in cardiomyocytes derived from iPS cells from the patient with Brugada syndrome (BrS) and his brother (Ctl).

Current	Condition	Current density (pA/pF)	Activation		Inactivation		Recovery from inactivation			Inactivation kinetics	
			$V_{1/2}$ (mV)	K	$V_{1/2}$ (mV)	K	τf (ms)	Af	τs (ms)	τf (ms)	τs (ms)
I_{Na}	**Ctl**	-59.2±3.4 (n=17)	-39.4±1.3	5.3±0.2	-83.4±1.3	5.3±0.1	9.7±0.6 (n=13)	67.7±1.4	109.1±6.8	1.1±0.1 (n=9)	2.9±0.3
	BrS	-35.5±2.5*** (n=42)	-36.1±0.7	5.2±0.2	-82.9±0.8	4.5±0.6	6.7±0.4** (n=33)	68.4±1.3	93.6±3.3	1.2±0.1 (n=20)	3.5±0.2
$I_{Ca,L}$	**Ctl**	-25.6±1.0 (n=34)	-18.6±0.6	5.5±0.1	-	-	-		-	-	-
	BrS	-17.3±1.2*** (n=24)	-18.6±0.6	5.8±0.1	-	-	-		-	-	-

Data are given as mean ± sem. Acronyms: $V_{1/2}$, voltage for half-activation or half-inactivation; K, slope of steady-state activation or inactivation curves; τf, τs, time constants of the fast and slow components, respectively, of inactivation or recovery from inactivation; Af, coefficient of the fast component of recovery from inactivation **p<0.01, ***p<0.001 *versus* control.

Table 3. Cell capacitance and biophysical properties of I_{Na} and $I_{Ca,L}$ in neonatal mouse cardiomyocytes infected with an adenovirus coding for GFP (Ad_GFP) alone or GFP and wildtype human *RAAD* gene (Ad_WT-RAD).

Current	Condition	Current density (pA/pF)	Activation		Inactivation	
			$V_{1/2}$	K	$V_{1/2}$	K
I_{Na}	**Ad_GFP**	-52.0±4.1 (n=9)	34.8±0.6	7.4±0.1	-83.3±1.2	6.9±0.1
	Ad_WT-RAD	-32.0±1.8*** (n=10)	-28.1±0.4***	8.4±0.1	-82.7±1.5	5.7±0.2
$I_{Ca,L}$	**Ad_GFP**	-6.1±1.7 (n=6)	-14.1±0.6	6.7±0.4	-	-
	Ad_WT-RAD	-1.7±0.5*** (n=8)	-11.2±0.6	6.2±0.3	-	-

Data are given as mean ± sem. Acronyms: $V_{1/2}$, voltage for half-activation or half-inactivation; K, slope of steady-state activation and inactivation curves. ***p<0.001 *versus* Ad_GFP.

Figure 1

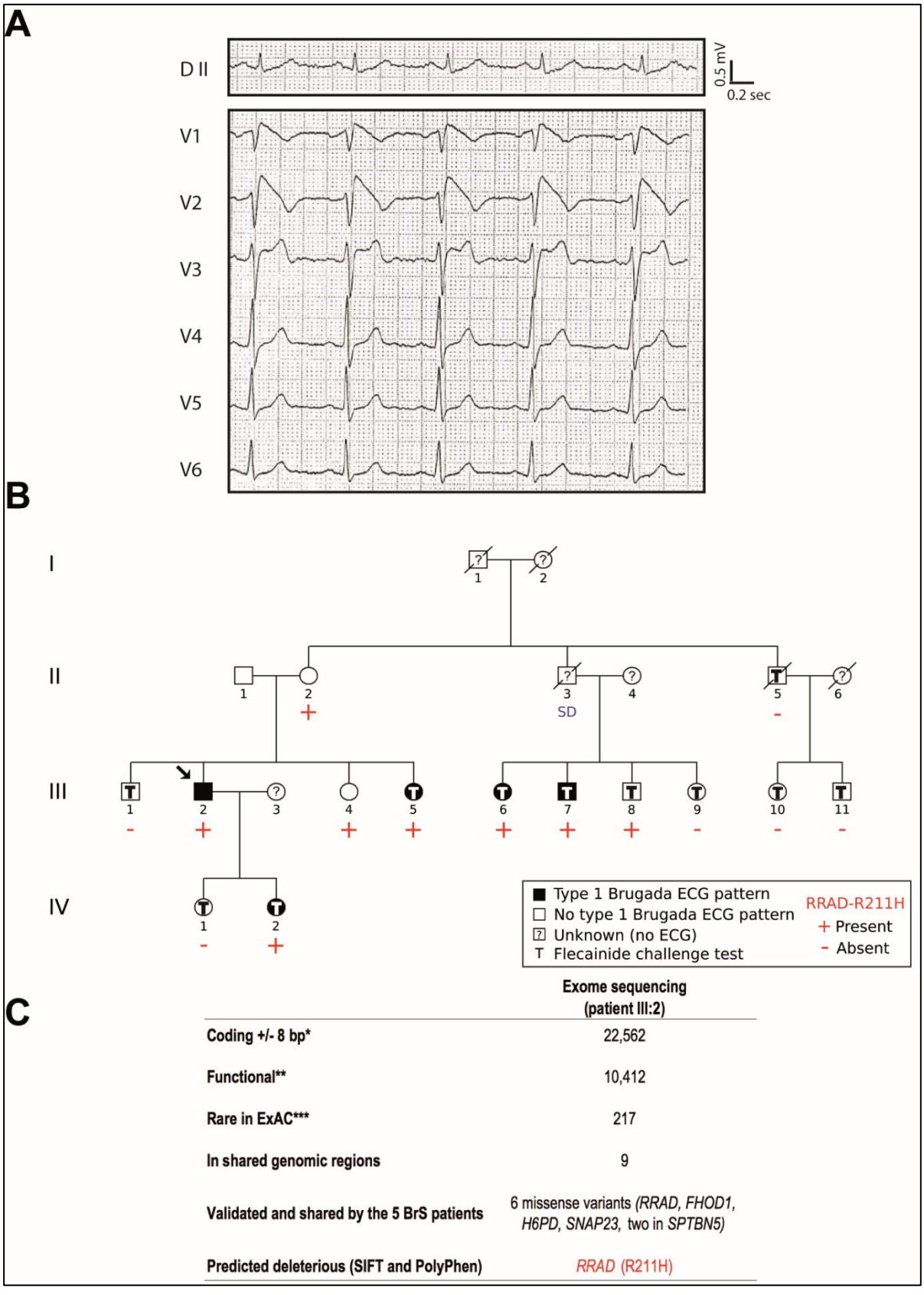

A
D II
V1
V2
V3
V4
V5
V6
0.5 mV
0.2 sec
B
I
II
III
IV
SD
Type 1 Brugada ECG pattern
No type 1 Brugada ECG pattern
Unknown (no ECG)
T Flecainide challenge test
RRAD-R211H
+ Present
- Absent
C
Exome sequencing (patient III:2)
Coding +/- 8 bp* 22,562
Functional** 10,412
Rare in ExAC*** 217
In shared genomic regions 9
Validated and shared by the 5 BrS patients 6 missense variants (RRAD, FHOD1, H6PD, SNAP23, two in SPTBN5)
Predicted deleterious (SIFT and PolyPhen) RRAD (R211H)

Figure 2

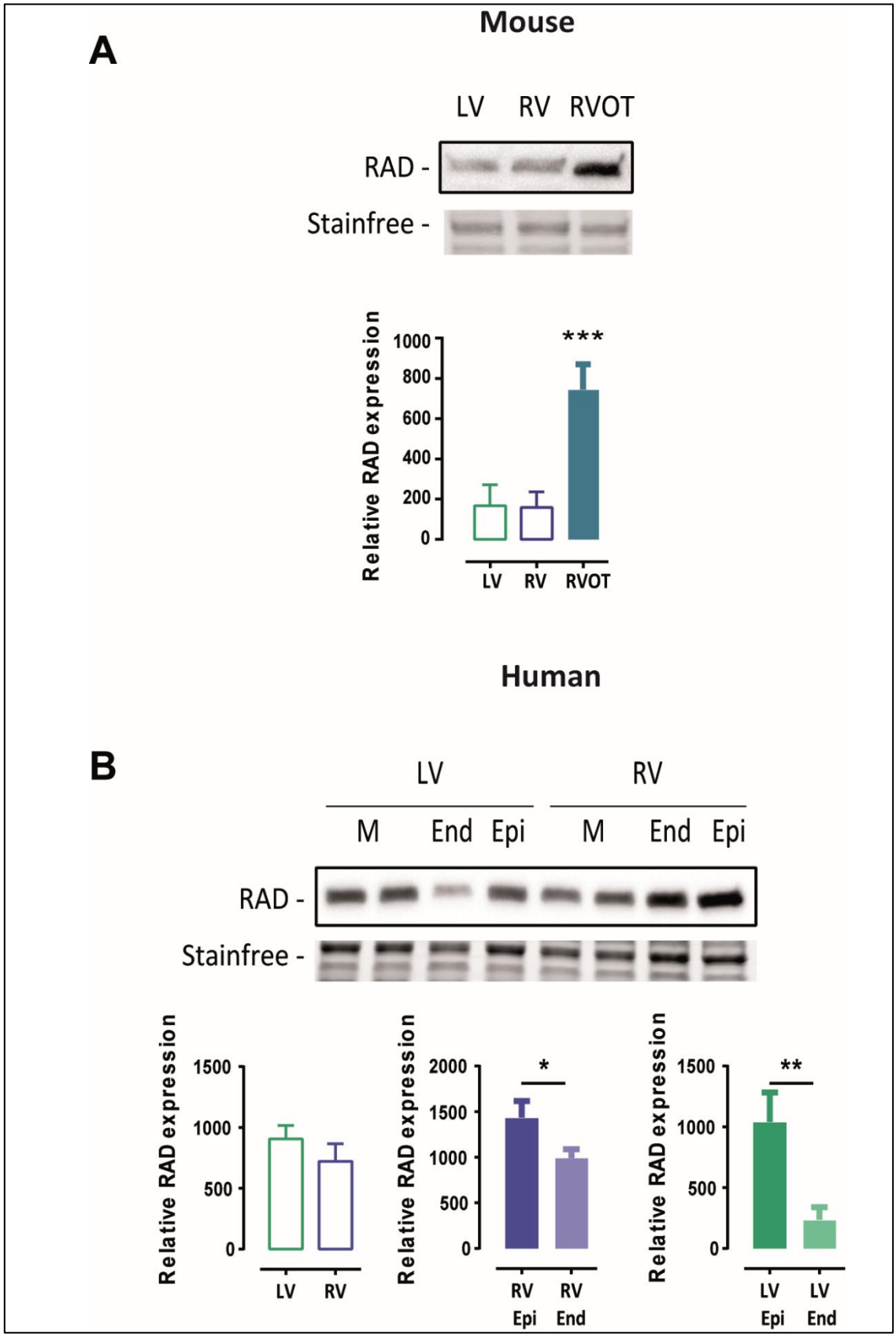

Mouse
A
LV RV RVOT
RAD -
Stainfree -
Relative RAD expression
1000
800
600
400
200
0
***
LV RV RVOT
Human
B
LV
RV
M End Epi M End Epi
RAD -
Stainfree -
Relative RAD expression
1500
1000
500
0
LV RV
2000
1500
1000
500
0
*
RV Epi
RV End
1500
1000
500
0
**
LV Epi
LV End

Figure 3

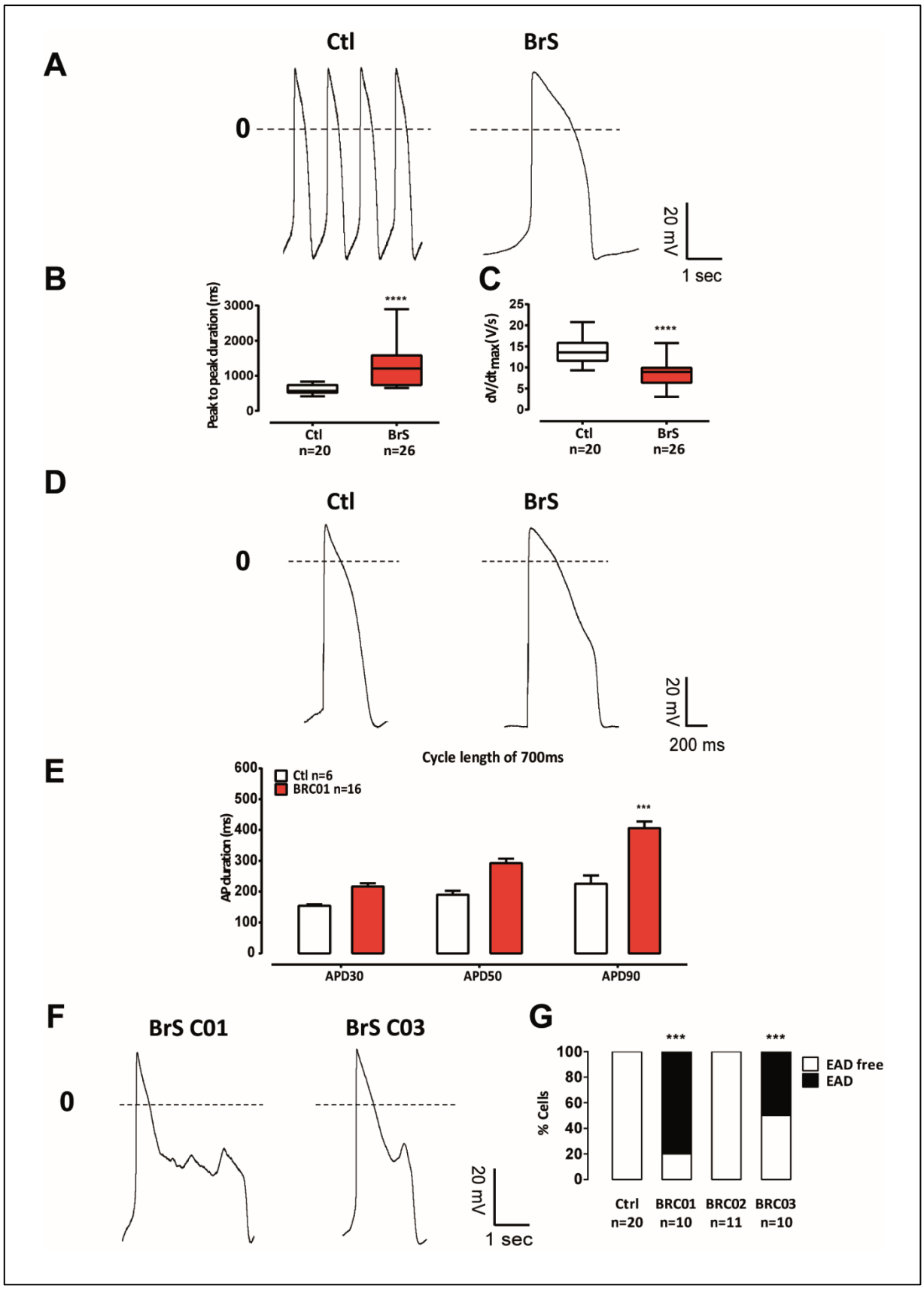

A
Ctl
BrS
0
20 mV
1 sec
B
Peak to peak duration (ms)
3000
2000
1000
0
****
Ctl
n=20
BrS
n=26
C
dV/dtmax (V/s)
25
20
15
10
5
0
****
Ctl
n=20
BrS
n=26
D
Ctl
BrS
0
20 mV
200 ms
Cycle length of 700ms
E
Ctl n=6
BRC01 n=16
AP duration (ms)
600
500
400
300
200
100
0
***
APD30
APD50
APD90
F
BrS C01
BrS C03
0
20 mV
1 sec
G
% Cells
100
80
60
40
20
0
***
***
EAD free
EAD
Ctrl
n=20
BRC01
n=10
BRC02
n=11
BRC03
n=10

Figure 4

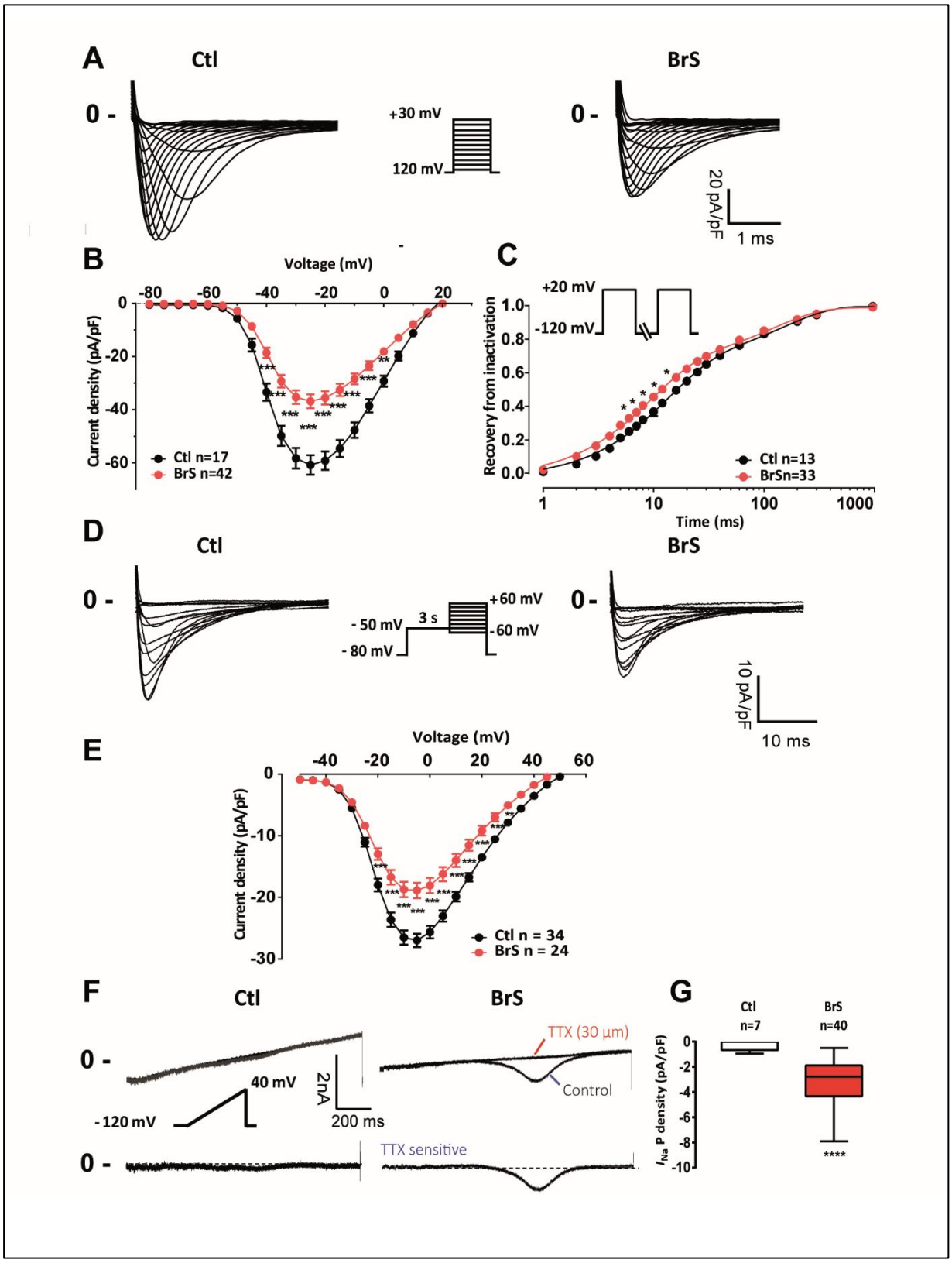

A
Ctl
BrS
0 -
+30 mV
120 mV
20 pA/pF
1 ms
B
Voltage (mV)
Current density (pA/pF)
Ctl n=17
BrS n=42
C
+20 mV
-120 mV
Recovery from inactivation
Ctl n=13
BrSn=33
Time (ms)
D
Ctl
BrS
- 50 mV
3 s
+60 mV
-60 mV
- 80 mV
10 pA/pF
10 ms
E
Voltage (mV)
Current density (pA/pF)
Ctl n = 34
BrS n = 24
F
Ctl
BrS
TTX (30 µm)
Control
40 mV
-120 mV
2nA
200 ms
TTX sensitive
G
Ctl
n=7
BrS
n=40
I_{Na} P density (pA/pF)
****

Figure 5

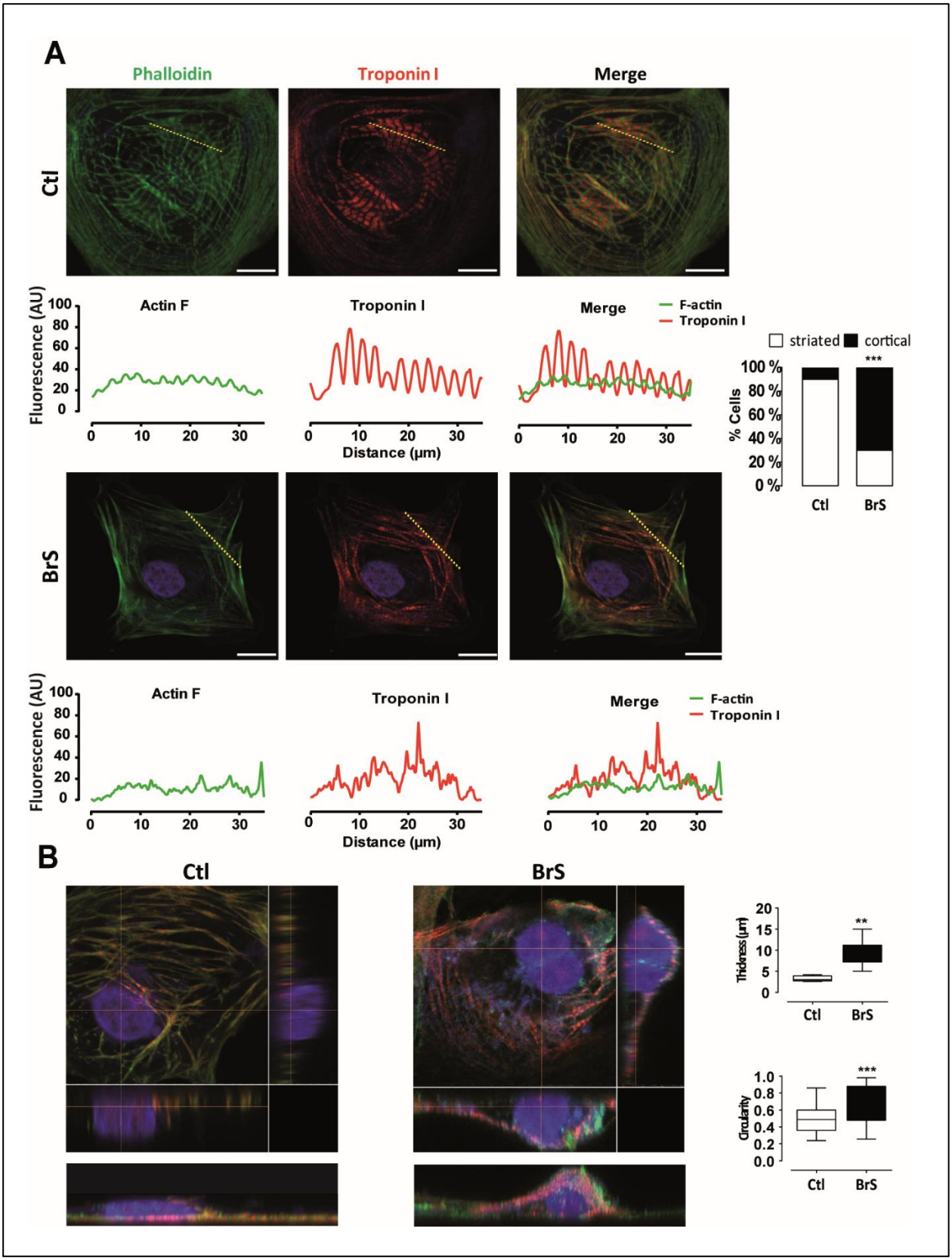
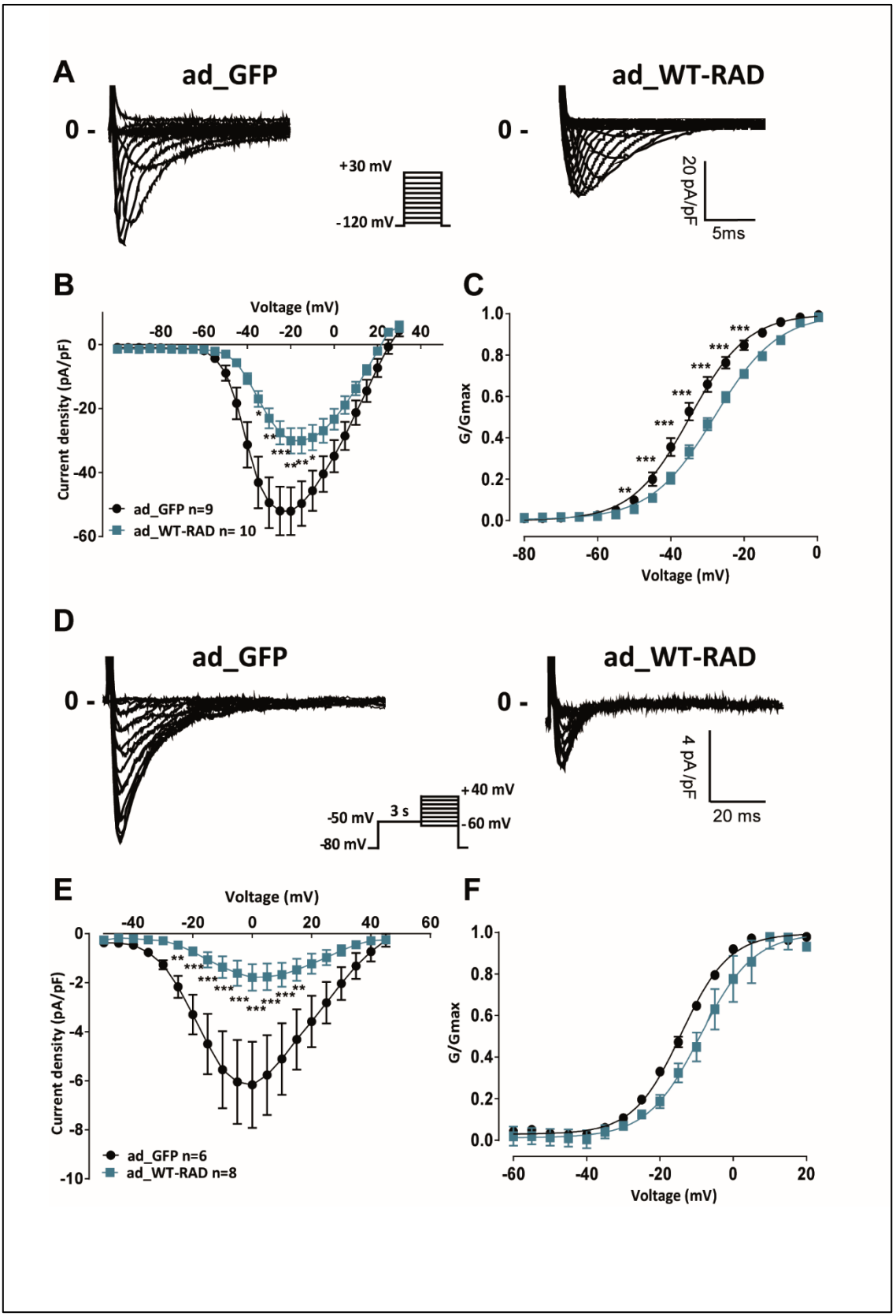
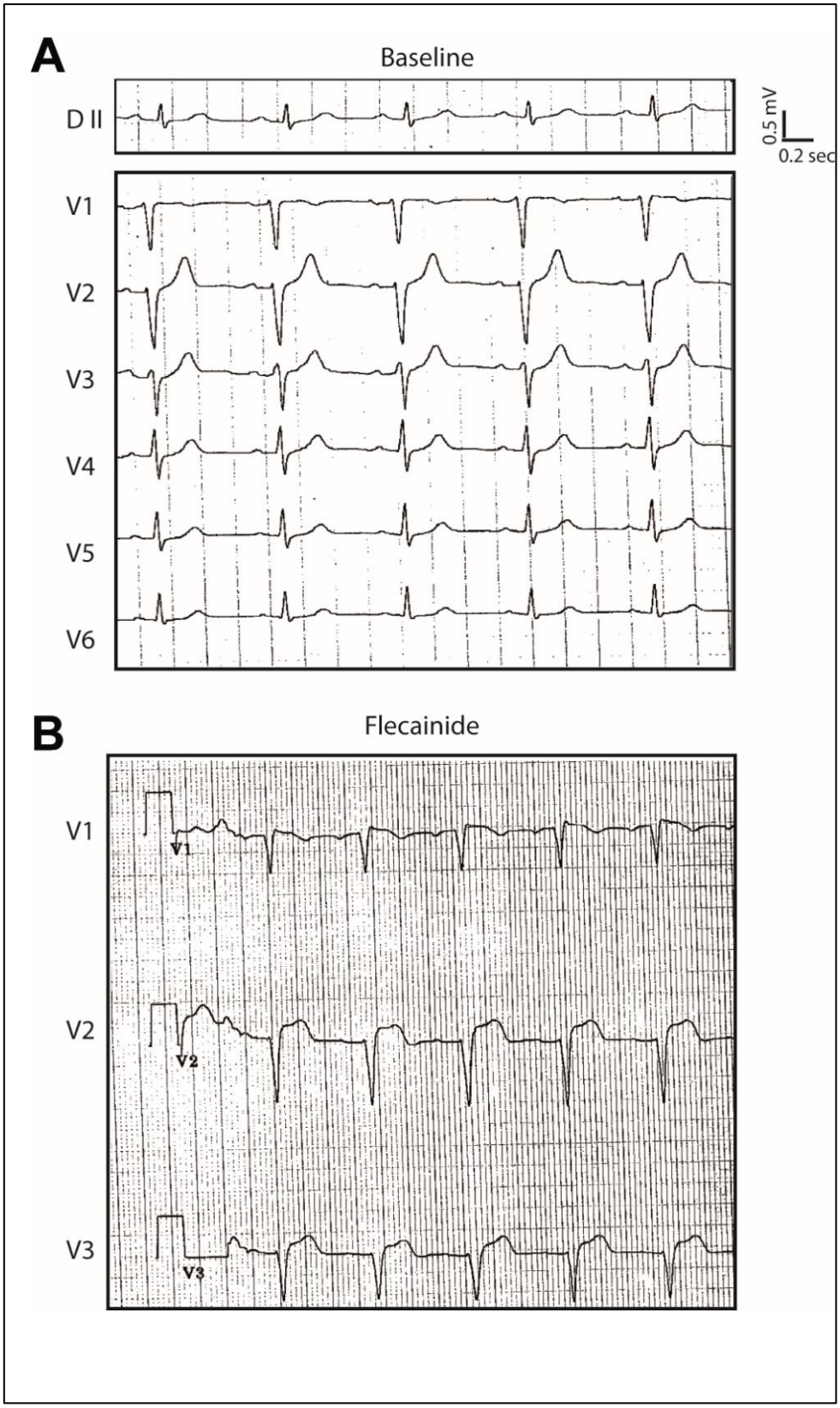

A
Phalloidin
Troponin I
Merge
Ctl
Actin F
Troponin I
Merge
F-actin
Troponin I
Fluorescence (AU)
Distance (µm)
striated
cortical
% Cells
***
Ctl
BrS
B
Ctl
BrS
Thickness (µm)
**
Circularity
***

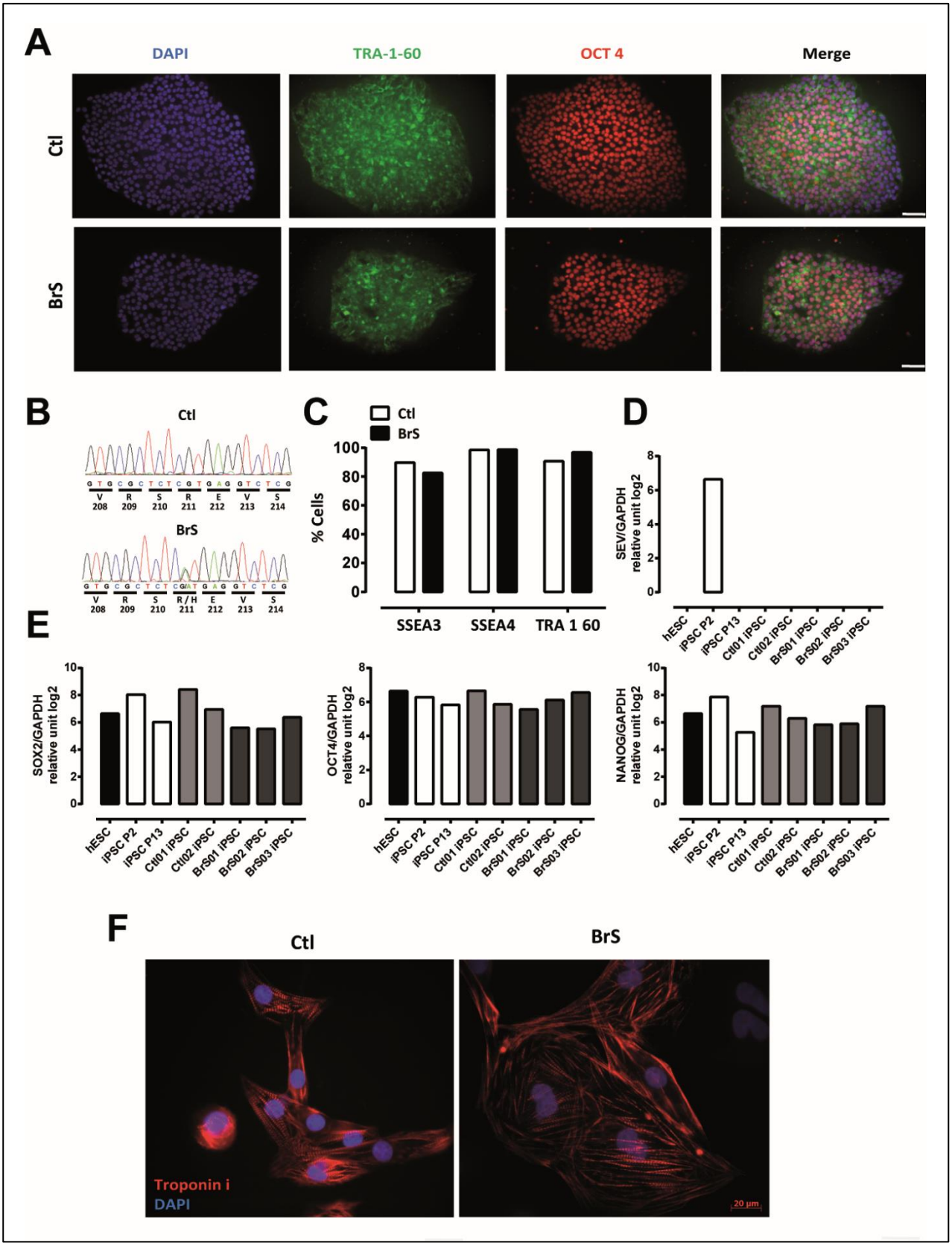
Figure 6


A
ad_GFP
ad_WT-RAD
0 -
+30 mV
-120 mV
20 pA/pF
5ms
B
Voltage (mV)
Current density (pA/pF)
ad_GFP n=9
ad_WT-RAD n= 10
C
G/Gmax
Voltage (mV)
D
ad_GFP
ad_WT-RAD
+40 mV
-50 mV
3 s
-60 mV
-80 mV
4 pA/pF
20 ms
E
Voltage (mV)
Current density (pA/pF)
ad_GFP n=6
ad_WT-RAD n=8
F
G/Gmax
Voltage (mV)

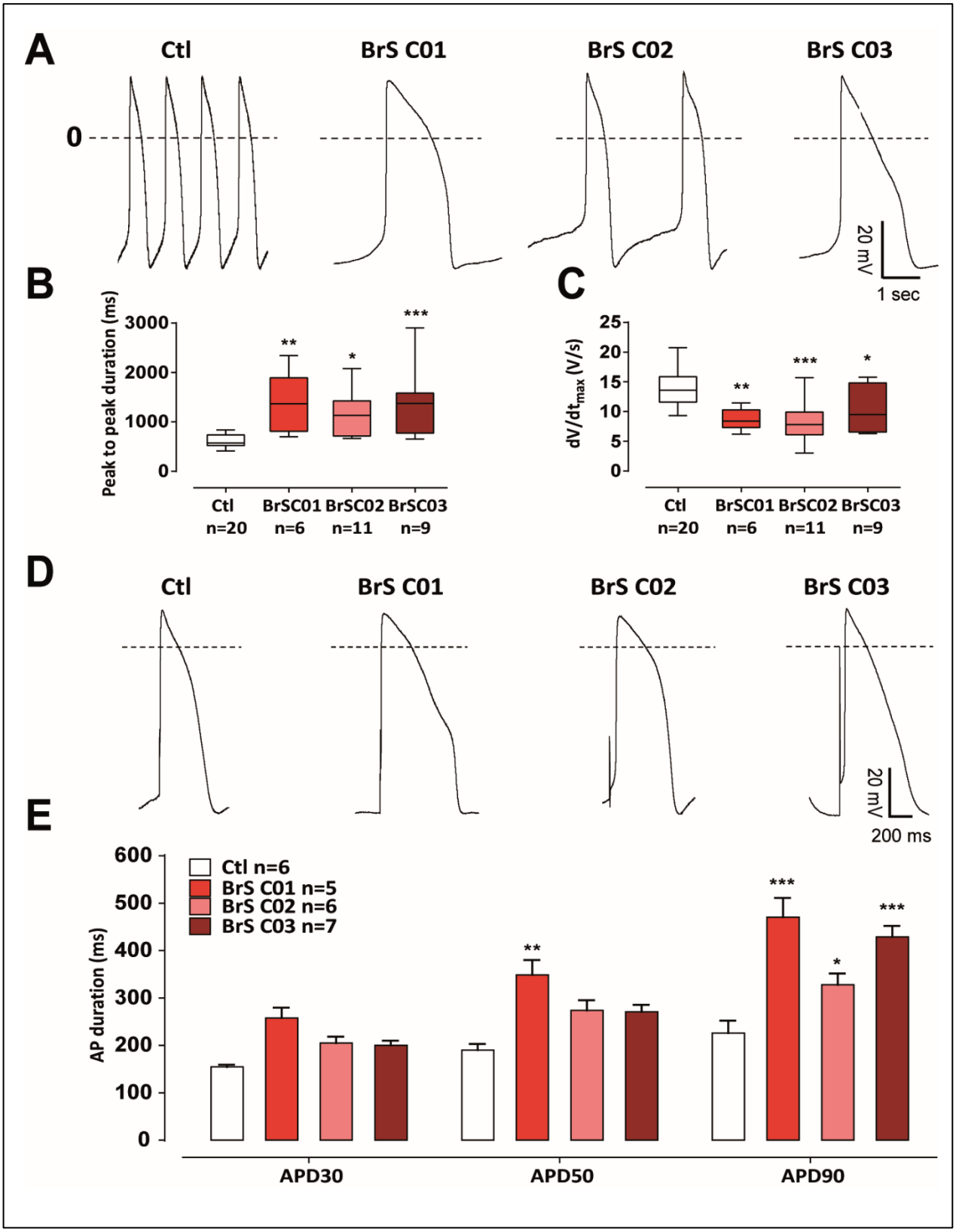
Supplemental figure 1



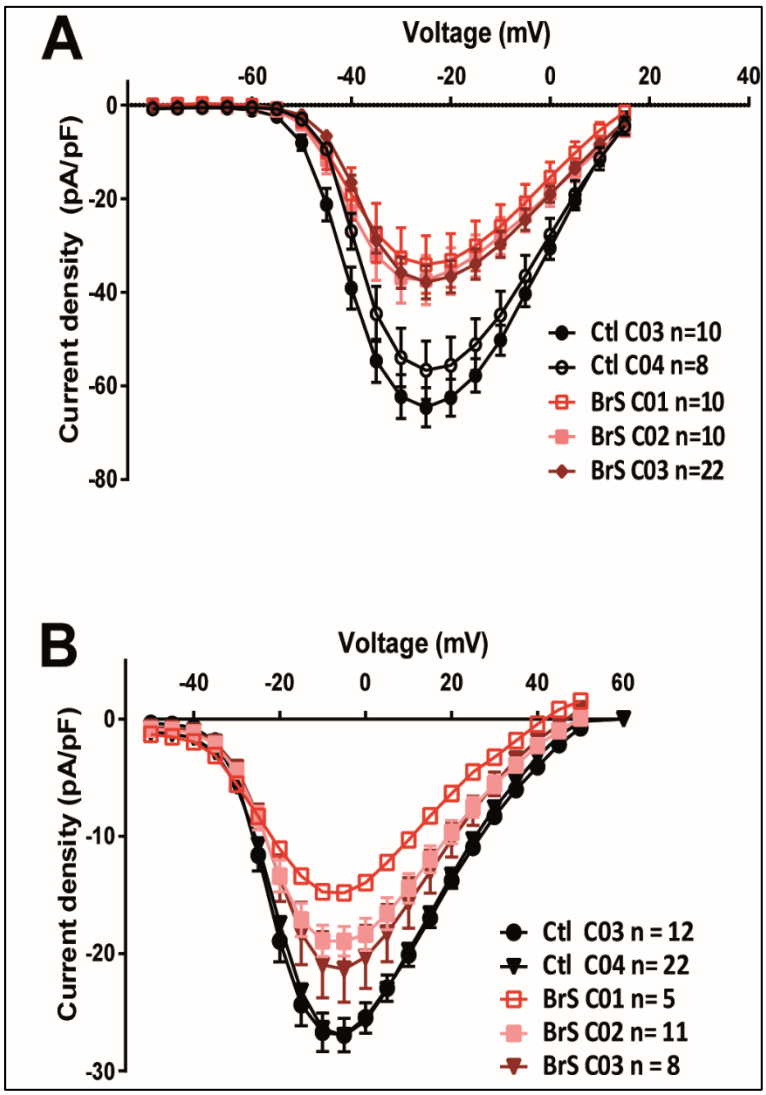
Supplemental figure 2



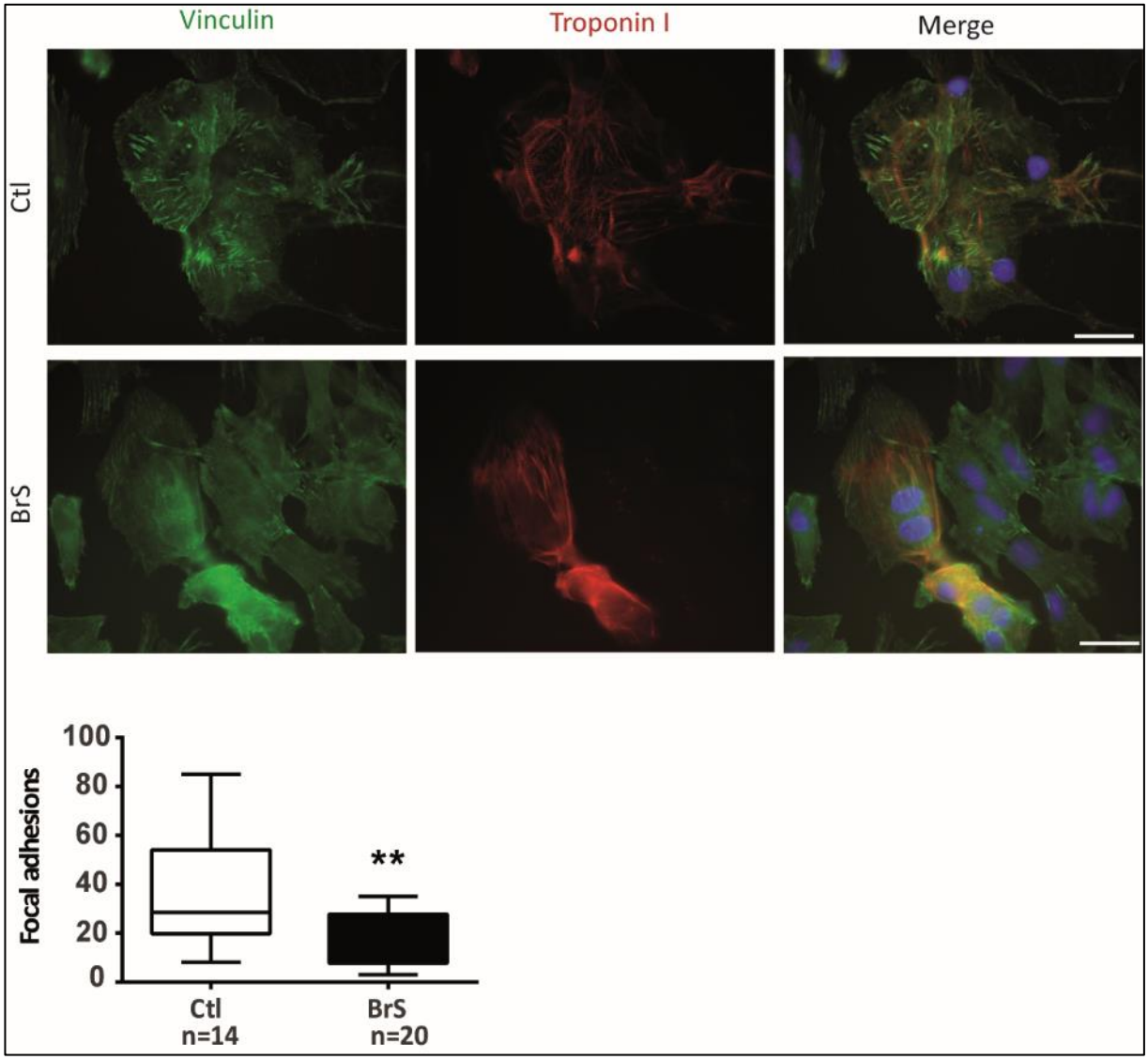
Supplemental figure 3



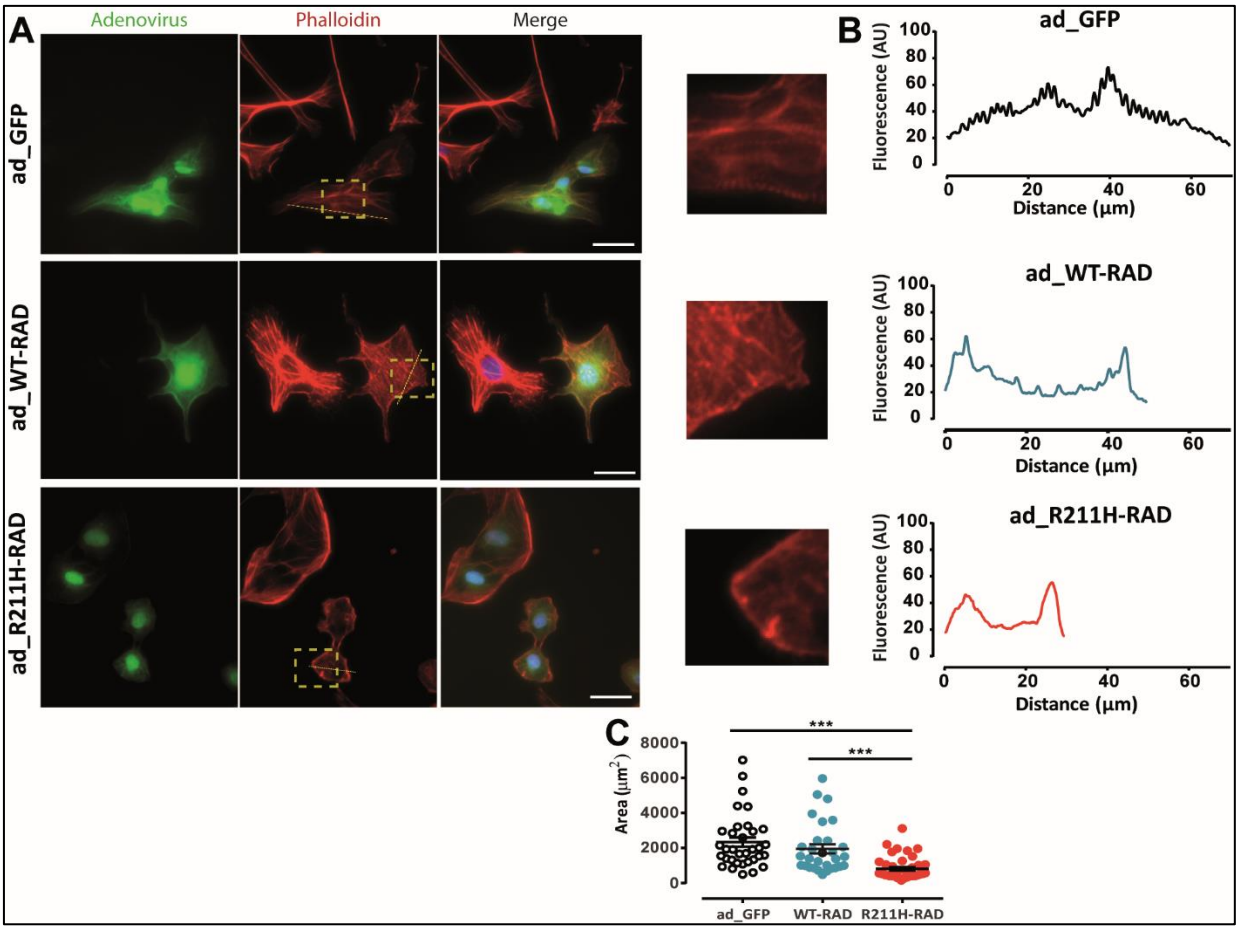
Supplemental figure 4



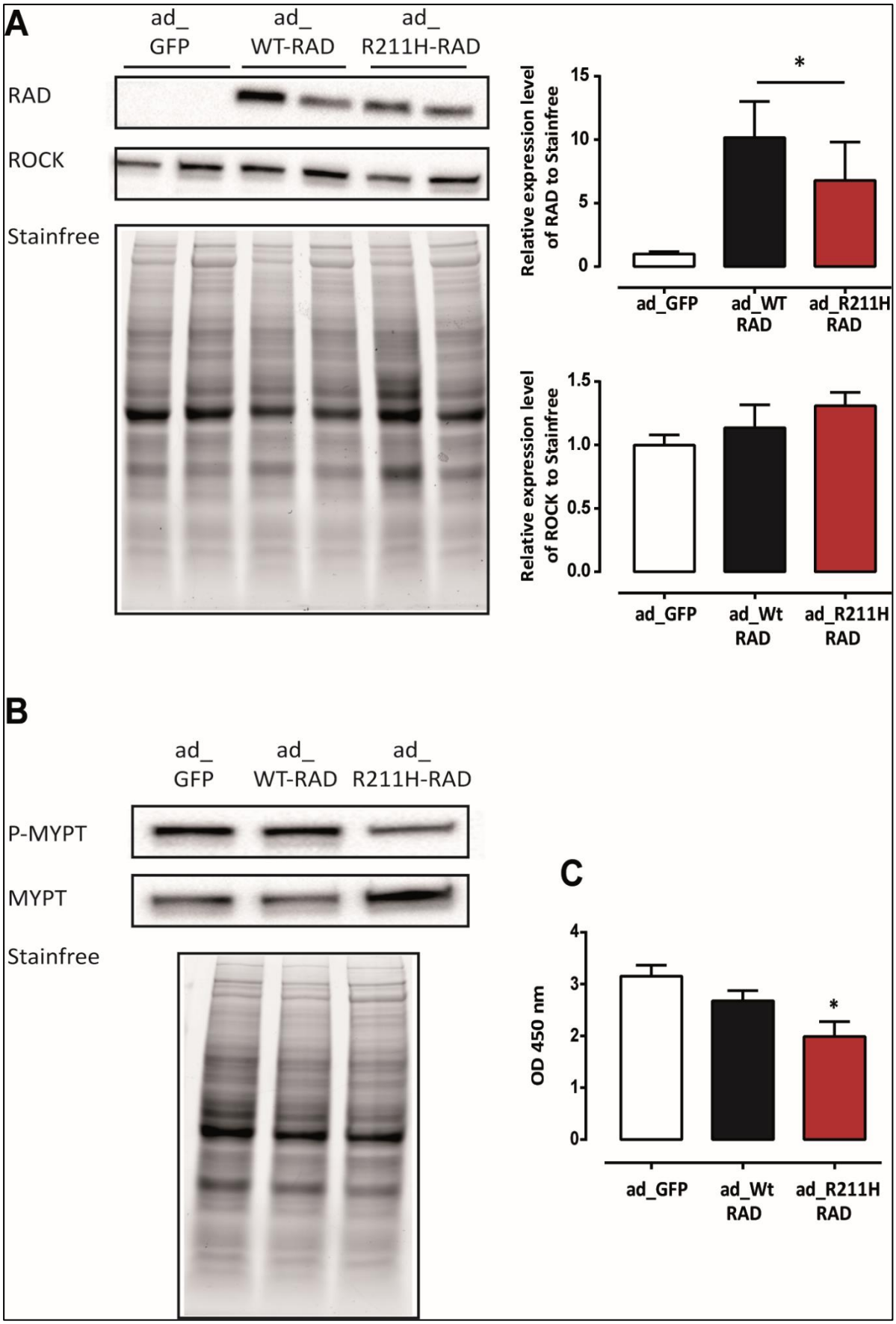
Supplemental figure 5



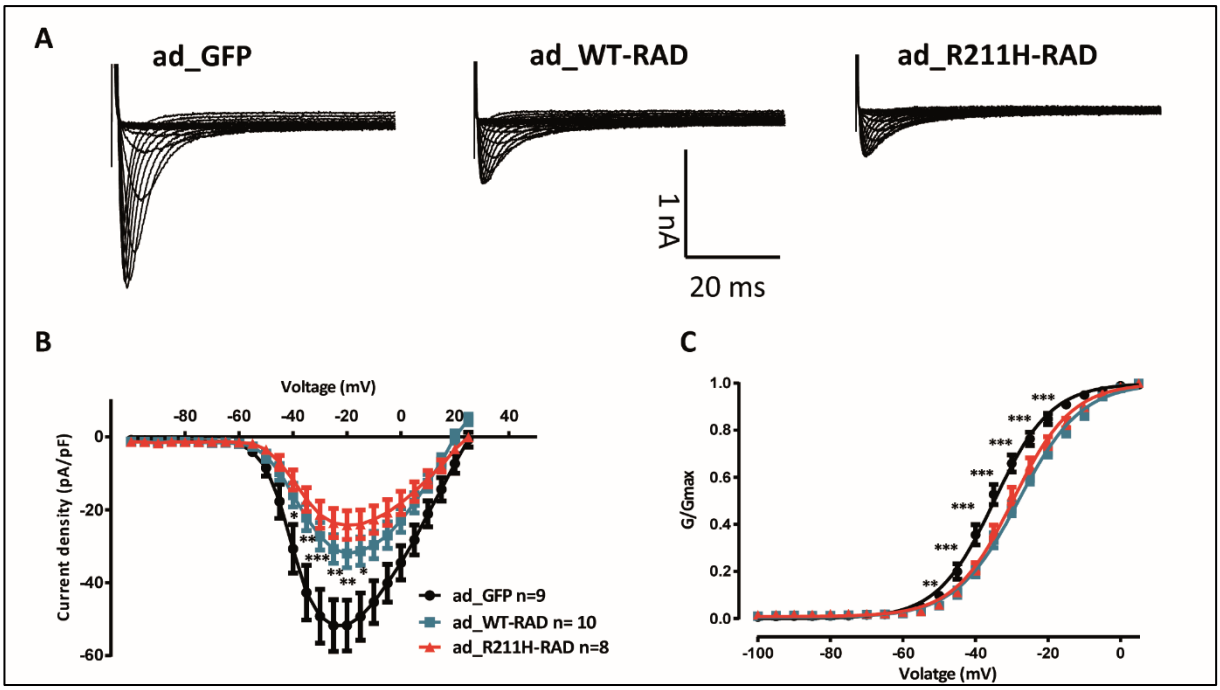
Supplemental figure 6



Supplemental figure 7



Supplemental figure 8



ONLINE DATA SUPPLEMENT

Online supplemental methods

The study was conducted according to the principles set forth under the Declaration of Helsinki (1989) and European guidelines for clinical and genetic research. Institutional review board approvals of the study were obtained before the initiation of patient enrollment. Informed written consent was obtained from each patient who agreed to participate in the clinical and genetic study.

H9 human embryonic stem cells were used as positive controls for human induced pluripotent stem cell characterization under agreement n°RE13-004 from the *Agence de la Biomédecine*.

Clinical recruitment

The diagnosis of Brugada syndrome (BrS) was based on the presence of a typical type 1 ECG pattern, either spontaneous or pharmacologically-induced, in at least one right precordial lead (V1, V2, V3) in the 3rd or 4th intercostal space, according to 2013 recommendations.[1] Two physicians blinded to the clinical and genetic status reviewed ECGs recorded before and during flecainide challenge. Measurements were performed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; http://rsb. info.nih.gov/ij) as previously described.[2] Clinical follow-up was collected prospectively from either the referring cardiologists or directly from the patients.

Exome sequencing and rare variant analysis

Exome sequencing was performed on the proband of a French family with 5 affected individuals. After Agilent SureSelect capture [3] sequencing was carried out on Illumina Genome Analyzer IIx to a mean depth of 87x, as previously described [4]. Reads were aligned to the human genome assembly GRCh37 with BWA-MEM (version 0.7.6a). Genetic variations (single nucleotide variants and indels) were called using Samtools v0.1.19, GATK Unified Genotyper and GATK Haplotype Caller v2.8 and were considered for further analyses if detected by at least two calling algorithms. Functional consequences were annotated using Variant Effect Predictor [5], with Ensembl release 75. Variants with the following consequences were selected: “transcript_ablation” (SO:0001893), “splice_donor_variant” (SO:0001575), “splice_acceptor_variant” (SO:0001574), “stop_gained” (SO:0001587), “frameshift_variant” (SO:0001589), “stop_lost” (SO:0001578), “start_lost” (SO:0002012), ”protein_altering_variant" (SO:0001818) “inframe_insertion” (SO:0001821), “inframe_deletion” (SO:0001822), “missense_variant” (SO:0001583), “transcript_amplification” (SO:0001889). Variants with a minor allele frequency < 0.1% in all ExAC populations (Exome Aggregation Consortium, http://exac.broadinstitute.org/, version 0.3, 60,706 individuals)[6] were considered as rare. Subsequently, allele frequencies from the gnomAD database were interrogated (genome Aggregation Database, http://gnomad.broadinstitute.org/, 138,632 individuals). The potential deleteriousness of missense variants was assessed with SIFT,[7] PolyPhen[8] and CADD.[9] Knime4Bio, a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME[10] was used for all filtering steps. To determine regions shared by all affected individuals (IBD, identity-by-descent), SNP genotyping was performed on population-optimized Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 array plates following the standard manufacturer's protocol. Fluorescence intensities were quantified using the Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument, and primary analysis was conducted with Affymetrix Power Tools following the

manufacturer's recommendations. All individuals had a genotype call rate above 97%. SNPs with a minor allele frequency (MAF) < 10%, a genotyping rate < 95% or with $P < 1 \times 10^{-4}$ when testing for Hardy-Weinberg equilibrium were excluded. IBD estimation was performed with IBDLD v3.34 using the NoLD option.[11] Shared regions were obtained by analyzing two sets of independent SNPs ($r^2<0.2$) using the PREGO cohort as a reference panel. Finally, all rare variants with potential functional consequence located in IBD regions were confirmed and tested for co-segregation by Sanger sequencing. Sanger sequencing was carried out on an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, using standard procedures.

Generation and characterization of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines

Generation of iPSC. The iPSC lines were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the proband (III:2; 3 lines: BRC01, BRC02, BRC03) and his unaffected brother (III:1) who did not carry the variant (2 lines: WTC03, WTC04) in the IPSC core facility of Nantes University. PBMCs were reprogrammed by Sendai viruses expressing Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc (CytoTune™-IPS 2.0 Sendai Reprogramming kit, Life Technologies). The iPSC clones were picked and expanded on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) feeder cells in KSR-FGF2 medium (DMEM/F12 supplemented with 0.1% β-mercaptoethanol, 20% knockout serum replacement, 10 ng/mL basic fibroblast growth factor, 2 mmol/L l-glutamine and 1% NEAA). Until P10, colonies were mechanically passaged with a needle. At P10, iPSC lines were adapted to feeder-free culture conditions: stem cell-qualified Matrigel-coated plates (0.1 mg/mL; BD Bioscience) with IPs Brew XF medium (StemMACS™, Miltenyi Biotec). Feeder-free iPSCs were passaged using the Passaging Solution XF (StemMACS™, Miltenyi Biotec).

Pluripotency confirmation. The expression of pluripotency markers in the generated cell lines was verified by RT-PCR for OCT4, NANOG, SOX2 (FAM-labeled TaqMan probes, Life technologies), and by flow cytometry for SSEA-3-PE, SSEA-4-PE, TRA-1-60-PE

(eBioscience), respectively. Total RNA was extracted from iPSC using Nucleospin® RNA plus kit from Macherey-Nagel according to the manufacturer's protocol. Flow cytometry data were analyzed using FACSDiva software.

RRAD locus genotyping. Genomic DNA was extracted from iPSC lines using the Nucleospin® tissue kit (Macherey-Nagel). Briefly, the *RRAD* locus was amplified using forward primer (GTGTGGCCAGAACAGGAAAC) and reverse primer (GGACTCAAGCTGAGCCAAGA) under standard PCR conditions. The 560-bp PCR product was next visualized following agarose gel electrophoresis. *RRAD* locus was verified by classic sequencing with 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

Cardiac differentiation of iPSCs and dissociation in single cells

***Differentiation into cardiomyocytes*.** All iPSC lines were differentiated according to the matrix sandwich method [12]. Before starting differentiation, iPSC colonies were transferred on stem cell-qualified Matrigel-coated plates (0.05 mg/ml; BD Biosciences) and cultured in StemMACS (iPS-Brew XF) medium (Miltenyi Biotec) with 1× Y-27632 Rho kinase (ROCK) inhibitor (Stemcell Technologies) in a normal oxygen atmosphere. When the cells reached monolayer confluence, the second layer of the sandwich was added using cold IPS Brew with Growth Factor Reduced Matrigel (0.33 mg/mL). The differentiation process was then initiated at day 0 following a protocol previously described [13].

Single cell dissociation. Twenty days after starting the differentiation, the iPSC-CMs were dissociated into single cells according to an established protocol [14]. Briefly, the cells were enzymatically dissociated using Collagenase type 2 (295 U/mg; Gibco) for 20 minutes at 37°C. Next, dissociated cells were maintained at room temperature for 30 minutes in Kraft-Bruhe solution containing (in mmol/L): KCl, 85; K_2HPO_4, 30; $MgSO_4$, 5; EGTA, 1; Na_2-ATP, 2; Na-pyruvate, 5; creatinine, 5; taurine, 20; glucose, 20; pH adjusted to 7.2 with KOH. Finally, they were plated on stem cell-qualified Matrigel-coated Petri dishes (35 mm, Nunc) in RPMI plus

B27 supplement and 1% NEAA. Patch-clamp experiments were performed from 11 to 15 days after cell dissociation.

Neonatal mouse cardiomyocytes

Neonatal mouse cardiomyocytes isolation and culture. Single cell suspensions from 1-2 day-old mouse hearts were prepared in a semi-automated procedure by using the Neonatal Heart Dissociation kit and the gentleMACS^{TM} Dissociator (Miltenyi Biotec). After excision of the hearts from the mice, the ventricles were separated from the atria. After the gentle MACS program running, the cell supernatant was removed by centrifugation and the pellet was resuspended in culture medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum and penicillin (100 U/mL)/ streptomycin (100 μg/mL). Then the cells were plated on 65-mm diameter Petri dishes (Nunc^{TM}). After 2 h of initial plating, the myocytes were resuspended in the same culture medium and plated on 35-mm diameter petri dishes at a density of 6 x 10^4 cells per plate.

Adenoviral infection of neonatal mouse cardiomyocytes. Adenoviruses encoding either human Rad and Green Fluorescence Protein (GFP; Ad-hRad-GFP) or GFP (ad-GFP) have been generated by Vector Biolabs after full-length cDNA of human *RRAD* was subcloned into Dual-U6 shuttle vector and checked by DNA sequencing. Adenoviral infection efficiency was assessed by measuring GFP fluorescence (510 nm) using fluorescence microscopy (Zeiss). Human Rad expression was quantified by RT-qPCR (FAM-labeled TaqMan probes, Life technologies) and Western Blot (Anti-RRAD antibody, Aviva Systems Biology). The potential cytotoxicity of the infection was evaluated by using noninvasive electrical impedance monitoring with the xCELLigence® RTCA DP apparatus (ACEA Biosciences, Inc). Based on these experiments, a multiplicity of infection (MOI) of 100 viral particles per cell has been chosen for both viruses. The cardiomyocytes were infected 24 hours after isolation in infection medium containing DMEM supplemented with 2% fetal bovine serum and penicillin

(100 U/mL)/ streptomycin (100 μg/mL) for 2 hours. Patch clamp experiments were performed 48 and 72 hours after infection.

Patch-clamp experiments

Data acquisition and analysis. Electrophysiological recordings were obtained on beating single cardiomyocytes (CMs) at 37°C using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Data were collected from a minimum of 3 independent differentiations per iPSC line and from at least 3 independent preparations of neonatal mouse CMs. Signals from I_{CaL} recordings were low-pass-filtered with a cutoff of 3 kHz and signals from I_{Na} recordings with a cutoff of 10 kHz. All recordings were analyzed using Clampfit 10.4 software. The composition of all patch-clamp solutions is provided in the online supplemental Table 3.

Action potential. Action potential (AP) recordings were performed using amphotericin-B-perforated patch-clamp configuration on single CMs differentiated from iPSCs (iPSC-CMs). Pipettes (borosilicate glass, Sutter instruments) were pulled to obtain tip resistances of 2-3 MΩ. APs were recorded first at spontaneous rates, then at various pacing cycle lengths using 1.3-1.5-ms pulses of 300-1500 pA. Only ventricular APs were selected for further analysis based on their duration, maximum upstroke velocity (dV/dt_{max}), spontaneous cycle length, amplitude and maximum diastolic potential, as previously defined.[13]

Membrane currents. Whole-cell recordings of I_{CaL}, I_{Na} and I_{NaP} were obtained using ruptured patch-clamp on both neonatal mouse CMs and iPSC-CMs in voltage clamp configuration. Waxed pipettes (borosilicate glass, Sutter instruments) were used with tip resistances of 1.5 to 2.5 MΩ. The current-voltage (I/V) relationship, steady-state activation and inactivation properties were evaluated using conventional voltage-clamp protocols shown in the relevant figures and currents densities were calculated by dividing current amplitude by membrane capacitance. Steady-state activation and inactivation curves were obtained using a Bolzmann fit: $I/I_{max} = A/\{1.0+exp[(V_{1/2} - V)/k]\}$. Time constant of inactivation of I_{CaL} and I_{Na}

were determined by fitting a biexponential curve through the decay phase of the current using the equation: $I/I_{max} = A_f \times exp(-t/T_f) + A_s \times exp(-t/T_s)$. For I_{CaL} recordings, holding potential was -80 mV and the interval between 2 voltage-clamp pulses was 8 sec. For I_{Na} recordings, holding potential was -100 mV and the interval between 2 voltage-clamp pulses was 2 sec for activation, 3 sec for inactivation and 4 sec for recovery from inactivation study protocols. For I_{NaP} recordings, we imposed ramp protocol (inset in figure 7) with an interval of 4 seconds xas left between sweeps.

Cytoskeleton characterization

***Cell dissociation*.** iPSC-CMs were dissociated 20 days after starting the differentiation with type 2 collagenase (295 U/mg; Gibco) in Hank's Balanced Salt Solution and plated in 8 well chambered coverslips (Ibidi) coated with stem cell-qualified Matrigel. Immunoflurescent labelling was performed 12 days after dissociation.

***Antibody and reagent*.** In order to target only cardiomyocytes, we labelled Troponin I (Santa Cruz biotechnology) as a cardiac differentiation flag jointly with actin using Phalloidin Alexa Fluor 488 (Life technology). To study focal adhesion complexes we labelled Vinculin in iPSC-CM (Abcam). We used Alexa Fluor 488 and 560 corresponding species secondary antibodies purchased from Invitrogen and nuclei were highlighted by DAPI incubation.

Acquisition and analysis. Photographs were obtained in collaboration with MicroPicell core facility (University of Nantes) using confocal microscopy (Nikon Eclipse A1), acquired with NIS element by Nikon and analyzed with Fiji processor. For focal adhesion quantification the image was pre-analyzed using Fiji than processed using the Focal Adhesion Analysis Server [15]. For each experiment, 20 iPSC-CMs differentiated from 3 clones for the BrS patient and 2 clones for the control individual. For neonatal mouse cardiomyocytes, 8-10 cells per culture have been studied and 3 cultures have been performed.

Rho kinase activity assay. Rho kinase activity was measured on neonatal mouse

cardiomyocytes overexpressing GFP (control), WT-hRad or R211H-hRad using the ROCK Activity Assay Kit from Cell Biolabs, Inc. The cells were dissociated at day 0, infected at day 1 and used at day 4. The cell lysate was first treated to extract total cytosolic protein fraction, which was used at a concentration of 50 µg per well for the assay.

Western Blot

The expression of Rad protein was investigated in mouse and human ventricular myocardium. For mice, after euthanasia by cervical dislocation, the hearts were quickly removed and the right ventricle outflow track, the remaining right ventricle free wall and the left ventricle free wall were carefully dissected. Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mmol/L): NaCl, 100; Tris-HCl, 50; EGTA, 1; 1% TritonX-100, Na_3VO_4, 1; NaF, 50; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 (Roche Applied Science); and protease inhibitor mixture (1:100 dilution; Sigma P8640) (pH 7.4). Extracted samples were sonicated and centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4°C. Total homogenate protein was quantified using the Pierce™BCA Protein Assay Kit. Forty µg of total protein was used plus 2 µl of NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) and 5 µl of NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen). The running was performed on 10% or 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-FreeTM Precast Gels (Bio-rad) and transferred on Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-rad). Membranes were blocked (using 5% non-fat milk) and incubated using Rad antibody (Aviva Systems Biology). The secondary antibody used was purchased from Santa Cruz and western blot revelation was performed using chemiluminescence camera (Biorad). Rad protein was quantified using image Lab software and normalized on stain free acquisition of the corresponding gels.

Statistics

Data are expressed as mean ± sem. Statistical analysis was performed with Prism5 (GraphPad Software, Inc.) or SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc.). Significant differences

were determined with Mann-Whitney rank sum test for comparison of two groups. For more than two groups, Kruskal-Wallis rank sum test and two-way analysis of variance were performed with Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons when appropriate. A p value of 0.05 indicated significance.

Online supplemental results

iPSC reprogramming and differentiation

PBMCs isolated from blood samples from the proband (BrS) and from his unaffected brother (Ctl) were reprogrammed into iPSCs upon infection with Sendai virus. Two Ctl iPSC clones (Ctl02 and Ctl02) and three BrS clones (BrS01, BrS02 and BrS03) were characterized (online supplemental Figure 2). Integrity and transmission of *RRAD* gene during reprogramming process was assessed. The sequencing results confirmed that iPSC reprogrammed from the proband carried *RRAD* p.R211H variant while control iPSC carried the WT sequence of *RRAD* gene (online supplemental Figure 2B). qRT-PCR analysis confirmed that both iPSC types were free from Sendai virus carrying the reprogramming factors sequences (online supplemental Figure 2D). Endogenous expression of the pluripotent stem cells markers, OCT4, NANOG and SOX2 was detected by qRT-PCR at level comparable to H9 human embryonic stem cells (online supplemental Figure 2E). Endogenous expression of OCT3/4 and TRA-1-60 proteins was also visualized by immunofluorescence staining (online supplemental Figure 2A) and flow cytometry analysis showed that more than 80% of Ctl and BrS iPSC were positive for the expression of pluripotency markers SSEA3, SSEA4 and TRA-1-60 (online supplemental Figure 2C). Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis (molecular karyotypes) revealed that Ctl and BrS iPSC clones did not present genomic duplication or deletion as compared to parental PBMCs (data not shown). Finally, the ability of both iPSC types to differentiate into cardiomyocytes was verified, with comparable Troponin I expression and organization in striations (online supplemental Figure 2F).

Online supplemental figures

Supplemental figure 1. ECG recordings of the patient III:8. A. DII peripheral lead and V1-V6 precordial leads ECG recordings under baseline condition. V1 and V2 were recorded in the 4th intercostal space **B.** V1-V3 leads ECG recordings under flecainide challenge.

Supplemental figure 2. Pluripotency validation and cardiac differentiation of the reprogrammed induced pluripotent stem cell (iPSC) lines. A. Representative Immunostaining of membrane pluripotency markers TRA-1-60 (FITC), nuclear pluripotency marker OCT4 (Rhodamine), DAPI and merged image for iPSC colonies obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). **B.** Sequencing of p.R211H-*RRAD* locus in both Ctl and BrS iPSC lines. **C.** FACS quantification of pluripotency markers SSEA3, SSEA4 and TRA-1-60 in both Ctl (white) and BrS (black) iPS cell lines. **D.** Expression of SEV transcript expressed by Sendai virus. Passage 2 reprogramming intermediates were used as positive control (iPSC P2 in white); human embryonic stem cells (hESC; in black) and passage 13 iPSCs (iPSC P13; in white) were used as negative controls. **E**. mRNA expression of pluripotency markers OCT4, NANOG and SOX2 in the same cell groups. **F.** Troponin I labelling (Rhodamine) in cardiomyocytes derived from Ctl and BrS iPSCs as a marker for cardiac differentiation. Scale bar, 20 µm.

Supplemental figure 3. Action potentials in cardiomyocytes differentiated from the different clones of induced pluripotent stem cells (iPSCs) obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). A. Representative action potential recordings of spontaneously beating cardiomyocytes differentiated from Ctl iPSC clones 1 and 2 (Ctl) and from BrS iPSC clones 1, 2 and 3 (BrS01, BrS02 and BrS03). **B-C**. Box plots of cycle length (B; spontaneous CL) and maximum upstroke velocity (C; dV/dT_{max}) of spontaneous action potentials. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Kruskal-Wallis rank sum test). **D**. Representative

action potentials recorded at a pacing cycle length of 700 ms in Ctl and BrS01-03 iPSC-CM lines. **E.** Mean action potential duration at 30% (APD_{30}), 50% (APD_{50}) and 90% (APD_{90}) of full repolarization. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (two-way analysis of variance with Bonferonni post-hoc test for multiple comparisons).

Supplemental figure 4. Sodium and calcium currents in cardiomyocytes differentiated from the different clones of induced pluripotent stem cells (iPSCs) obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). A-B. I_{Na} (A) and I_{CaL} (B) current density-membrane voltage relationships for the cardiomyocytes differentiated from Ctl iPSC clones 1 and 2 (Ctl01 and Ctl02) and from BrS iPSC clones 1, 2 and 3 (BrS01, BrS02 and BrS03).

Supplemental figure 5. Focal adhesion in cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells obtained from the proband (BrS) and his unaffected brother (Ctl). Top. Representative images of immunostaining of vinculin (FITC), troponin I (rhodamine) and merged acquisitions with DAPI. Scale bars: 25 µm. **Bottom.** Box plots of the number of focal adhesion per cell. ** p< 0.01 (Mann Whitney rank sum test).

Supplemental figure 6. Cytoskeleton in neonatal mouse cardiomyocytes transduced with adenoviruses encoding Green Fluorescence Protein alone (ad_GFP), GFP and wildtype *RRAD* (ad_WT-RAD) or GFP and *RRAD* p.R211H variant (ad_R211H-RAD). A. Representative images of GFP fluorescence (indicating the transduced cardiomyocytes), F-actin cytoskeleton staining with phalloidin and merged acquisitions with DAPI for each condition. Scale bars: 50 µm. Right panels are zoomed views of the merged images. **B.** Corresponding F-actin fluorescence distribution measured at the level of the yellow dotted lines. **C.** Cell size quantification and comparison for each group (GFP n=32, WT-hRad n=28, Rad R211H n=22). *** p< 0.001 (Mann Whitney rank sum test).

Supplemental figure 7. Rho kinase (Rock) expression and function in neonatal mouse cardiomyocytes transduced with adenoviruses encoding Green Fluorescence Protein alone (ad_GFP), GFP and wildtype *RRAD* (ad_WT-RAD) or GFP and *RRAD* p.R211H variant (ad_R211H-RAD). A. Representative western blots showing human RAD and mouse Rock expression in the three experimental conditions, with corresponding stain free membrane. The graphs show the mean ± sem RAD and Rock expression (normalized to stain free). **B.** Western blot with corresponding stain free membrane showing mouse myosin phosphatase targeting protein (Mypt) and phospho-Mypt expression in the three experimental conditions. **C.** Rho kinase activity assay results for Mypt phosphorylation levels in each condition. For all panels, the number of cell isolations per experimental condition was 3. * $p< 0.05$ (Mann Whitney rank sum test).

Supplemental figure 8. Sodium current in neonatal mouse cardiomyocytes overexpressing GFP, WT-RAD and R211H-RAD. A. Superimposed representative I_{Na} and traces recorded in neonatal mouse cardiomyocytes overexpressing GFP, WT-RAD and R211H-RAD proteins. **B.** Mean current density-membrane potential relationship for I_{Na} in the three conditions. **C.** Conductance-membrane voltage relationships for I_{Na} in ad_GFP, ad_WT-RAD and ad_R211H-RAD cardiomyocytes. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ (two-way analysis of variance with Bonferonni post-hoc test for multiple comparisons).

References

1. Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. HRS/EHRA/APHRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013;10:1932-63.
2. Therasse D, Sacher F, Petit B, et al. Sodium-channel blocker challenge in the familial screening of Brugada syndrome: Safety and predictors of positivity. *Heart Rhythm* 2017;(July). doi:10.1016/j.hrthm.2017.06.031.
3. Coffey AJ, Kokocinski F, Calafato MS, et al. The GENCODE exome: sequencing the complete human exome. *Eur J Hum Genet* 2011;19:827-31.
4. Portero V, Le Scouarnec S, Es-Salah-Lamoureux Z, et al. Dysfunction of the voltage-gated K^+ channel β2 subunit in a familial case of Brugada syndrome. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e003122.
5. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 2016;17:122.
6. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;536:285-91.
7. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009;4:1073-1081.
8. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248-9.
9. Kircher M, Witten DM, Jain P, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;46:310-5.
10. Lindenbaum P, Le scouarnec S, Portero V, Redon R. Knime4Bio: A set of custom nodes

for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics* 2011;27:3200-1.

11. Han L, Abney M. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genet Epidemiol*. 2011;35:557-67.
12. Zhang J, Klos M, Wilson GF, et al. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method. *Circ Res* 2012;111:1125-36.
13. Jouni M, Si-Tayeb K, Es-Salah-Lamoureux Z, et al. Toward personalized medicine: Using cardiomyocytes differentiated from urine-derived pluripotent stem cells to recapitulate electrophysiological characteristics of type 2 long QT syndrome. *J Am Heart Assoc* 2015;4:1-13.
14. Terrenoire C, Wang K, Chan Tung KW, et al. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. *J Gen Physiol* 2013;141:61-72.
15. Berginski ME, Gomez SM. The Focal Adhesion Analysis Server: a web tool for analyzing focal adhesion dynamics. *F1000Research* 2013;2:68.

Online supplemental table 14. Rare variants shared by the 5 affected family members

Gene variant	*RRAD*	*FHOD1*	*SPTBN5*	*SPTBN5*	*SNAP23*	*H6PD*
Variant position, allele frequency and predicted pathogenicity						
Genomic position (hg19)	chr16:66957436 C>T	chr16:67268268 C>T	chr15:42159782 C>T	chr15:42168786 T>C	chr15:42823617 A>G	chr1:9324684 A>G
HGVSp	NP_004156.1: p.Arg211His	NP_037373.2: p.Gly476Glu	NP_057726.4: p.Arg2089His	NP_057726.4: p.Glu1304Gly	NP_570710.1: p.Thr140Ala	NP_004276.2: p.Asp711Gly
ExAC AF (v0.3.1)	8.274e-6 (1/120860)	1.313e-4 (14/106658)	8.282e-6 (1/120746)	Absent	8.291e-6 (1/120614)	3.028e-4 (36/118900)
gnomAD AF (v2.0)	4.125e-6 (1/242446)	1.077e-4 (29/269262)	2.526e-5 (7/277126)	1.12e-5 (3/267860)	8.913e-6 (2/224396)	3.484e-4 (96/275570)
GERP score	4.81	4.22	-1.33	0.1	3.31	5.62
CADD PHRED	35	8.425	11.46	Unknown	12.76	16.28
PolyPhen/ SIFT	probably_damaging/ deleterious	benign/ tolerated	benign/ -	benign/ -	benign/ tolerated	benign/ tolerated
Familial segregation						
II:2 (U)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
II:5 (U)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-
III:1 (U)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
III:2 (A)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
III:4 (U)	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-
III:5 (A)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
III:6 (A)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
III:7 (A)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
III:8 (U)	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
III:9 (U)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
III:10 (U)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-
III:11 (U)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-
IV:1 (U)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
IV:2 (A)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

AF: allele frequency. A: affected, U: unaffected (see Figure 1B and Table 1). CADD scores were obtained from http://cadd.gs.washington.edu/download. Mutational status could not be determined for individuals I:1, I:2, II:1, II:3, II:4, II:6 and III:3 (no DNA available).

Online supplemental table 15. *RRAD* rare variants in 187 Brugada index cases and 404 controls

Carriers	*RRAD variants in BrS cases*				*RRAD variants in controls*	
	Proband (familial case)	2nd case (isolated case)	3rd case (isolated case)	4th case (isolated case)	1 control	
Age at diagnosis	41 yo	46 yo	35 yo	37 yo	N/A	
Genomic position (hg19)	chr16:66957436 C>T	chr16:66958947 C>A	chr16:66957511 T>C	chr16:66957425 C>T	chr16:66956194 G>C	chr16:66956195 G>T
HGVSp (NP_004156.1)	p.Arg211His	p.Asp46Tyr	p.Gln186Arg	p.Val215Met	p.His237Gln	p.His238Asp
ExAC AF (v0.3.1)	8.274e-6 (1/120860)	-	4.944e-5 6/121358	1.669e-5 2/119846	-	-
gnomAD AF (v2.0)	4.125e-6 (1/242446)	-	4.468e-5 11/246168	2.077e-5 5/240752	-	-
GERP score	4.81	4.38	4.81	3.83	5.8	2.42
CADD PHRED score	35	Unknown	23.5	22.9	Unknown	Unknown
PolyPhen/ SIFT	probably_damaging/ deleterious	possibly_damaging/ deleterious	probably_damaging/ tolerated	benign/ tolerated	benign/ tolerated	probably_damaging/ deleterious

AF: allele frequency. Screening for rare variants was performed by Sanger sequencing in cases and whole-genome sequencing in controls. *RRAD* variants were identified in 4/187 BrS cases and 1/404 controls.

Online supplemental table 3. Composition of patch-clamp solutions (in µmol/L).

	Tyrode	Action potential int.	I_{CaL} int.	I_{CaL} ext	iPSC-CMs			NM-CMs	
					I_{Na} int.	I_{Na} ext.	I_{NaP} ext.	I_{Na} int.	I_{Na} ext.
NaCl	140	5	5		3	20	130	5	25
KCl	4	20							
CsCl			145		133	110	10	105	94
TEA-Cl				160	2				25
$CaCl_2$	1		2	5				4	1
$MgCl_2$	1			1	2	1	1		2
$CoCl_2$						1.8	1.8		2.5
K-gluconate		125							
Na_2ATP					2				
MgATP			5					5	
EGTA			5		5			10	
HEPES	10	5	10	10	5	10	10	10	10
glucose	10			10		10	10	5	
mannitol				20		20	20		20
Tetrodotoxin				0.03					
Amphotericin B		0.85							
pH (adjusted with)	7.4 (NaOH)	7.2 (KOH)	7.2 (CsOH)	7.4 (CsOH)	7.2 (CsOH)	7.4 (CsOH)	7.4 (CsOH)	7.2 (CsOH)	7.4 (CsOH)

Abbreviations are: int., intrapipette solution; ext., extracellular medium, iPSC-CMs, induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, NM-CMs, neonatal mouse cardiomyocytes; TEA, TetraEthylAmmonium.

Résultats supplémentaires

La section « Résultats » du présent manuscrit n'inclut que les résultats non présentés dans l'article 1 et les expérimentations qui ont permis de générer les données présentées dans cette section sont détaillées dans la partie « matériel et méthodes » du manuscrit mais peuvent référer aux résultats présentés dans l'article 1.

1. Caractérisation de Rad dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées :

1.1. Le cytosquelette d'actine :

En plus de l'effet de Rad WT sur l'intégrité du cytosquelette d'actine et l'effet plus exacerbé induit par le variant p.R211H, cette accumulation de l'actine au niveau de la membrane plasmique semble avoir un effet sur la morphologie de la cellule infectée (Figure supplémentaire 6, article 1). En effet, comme le montre la figure 18, les cellules infectées avec le variant Rad p.R211H semblent plus petites lorsqu'on mesure leur surface sur un même plan. Mais lorsqu'une acquisition 3D est faite sur ces cellules, on constate que le volume des cellules infectées est plus important et elles sont plus rondes et moins étalées que les cellules infectées avec le virus GFP.

1.2. Les points focaux d'adhésion :

L'augmentation de la circularité et du volume des cellules exprimant le variant p.R211H peut être due à une perturbation de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, un marquage de la protéine Paxilline a été effectué sur les cellules exprimant la GFP, Rad-Wt et Rad-p.R211H. La Paxilline fait partie du complexe protéique formant les points focaux d'adhésion. Outre leur rôle dans l'adhésion, ces protéines régulent aussi la fonction migratoire des cellules et leur perception des signaux issus de l'environnement mécanique extracellulaire.

La figure 19 montre dans la section A des exemples de cellules infectées par les 3 adénovirus étudiés (en vert-GFP). Le marquage de la paxilline (en rouge) et la combinaison de ce marquage avec le signal émis par la GFP permettent de mettre en évidence l'effet de l'infection sur la paxilline. Des mesures de taille, de nombre et de degré d'élongation des agrégats de paxilline ont été effectuées et comparées entre chaque condition. Les

cardiomyocytes surexprimant le mutant présentent un nombre de points focaux d'adhésion significativement réduit par rapport à celui des cardiomyocytes exprimant la forme sauvage ou la GFP. Les autres paramètres mesurés ne présentent pas de différence significative entre les trois conditions (Figure 19B).

1.3. Les jonctions intercellulaires :

Etant donné l'effet du variant p.R211H de Rad sur l'intégrité du cytosquelette d'actine et sur les points focaux d'adhésion des cardiomyocytes infectés, l'éventualité que les jonctions intercellulaires soient perturbées est envisageable. Des marquages de la N-Cadhérine ont été effectués sur les trois groupes de cellules exprimant simplement la GFP, ou Rad WT ou encore Rad p.R211H. Un amas de cardiomyocytes non infectés a été marqué pour montrer la localisation de la N-cadhérine à la jonction des cellules connectées. Un exemple de chaque condition est montré en figure 20. Les cellules vertes sont les cellules infectées et la N-cadhérine a été marquée en rouge. Les cardiomyocytes exprimant la GFP seule présentent un marquage de N-cadhérine localisé en périphérie des cellules infectées et l'intensité du marquage augmente lorsque la cellule infectée est connectée à une autre cellule. Pour la condition Rad WT, le marquage de la N-cadhérine est localisé au niveau de la membrane plasmique alors que pour la forme Rad p.R211H, la N-cadhérine semble distribuée de façon plus diffuse même si elle semble plus localisée au niveau de la jonction des deux cellules jointes (Figure 20).

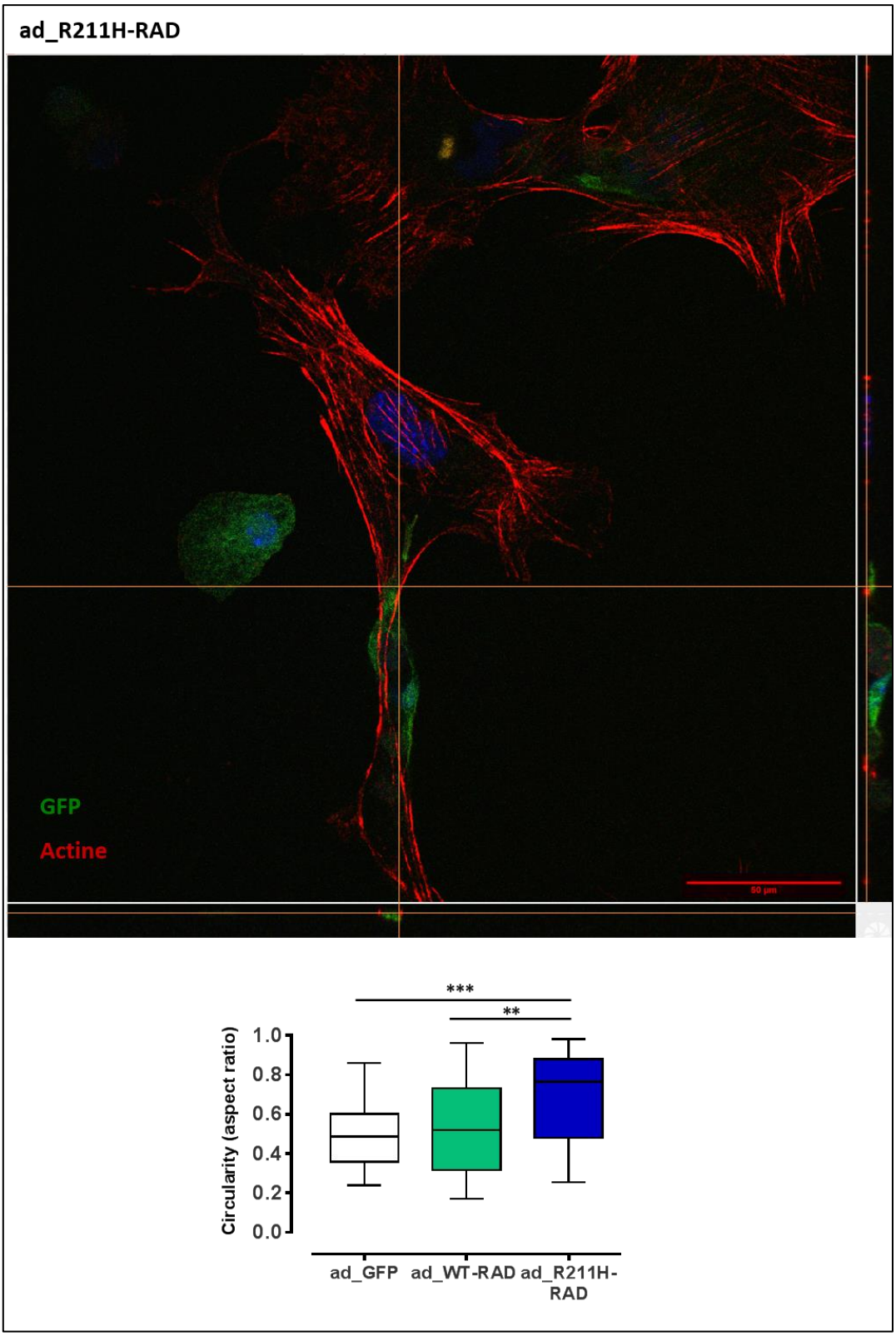


Figure 18 : Augmentation de la circularité des cardiomyocytes infectées avec le variant Rad R211H.

Acquisition 3D de cardiomyocytes infectés avec ad_R211H-RAD (vert) et d'un cardiomyocyte non infecté marqués avec la Phalloidine (rouge). Mesure de la circularité des cellules infectées avec les 3 adénovirus étudiés (GFP : blanc, WT-RAD (vert) et R211H-RAD (bleu).

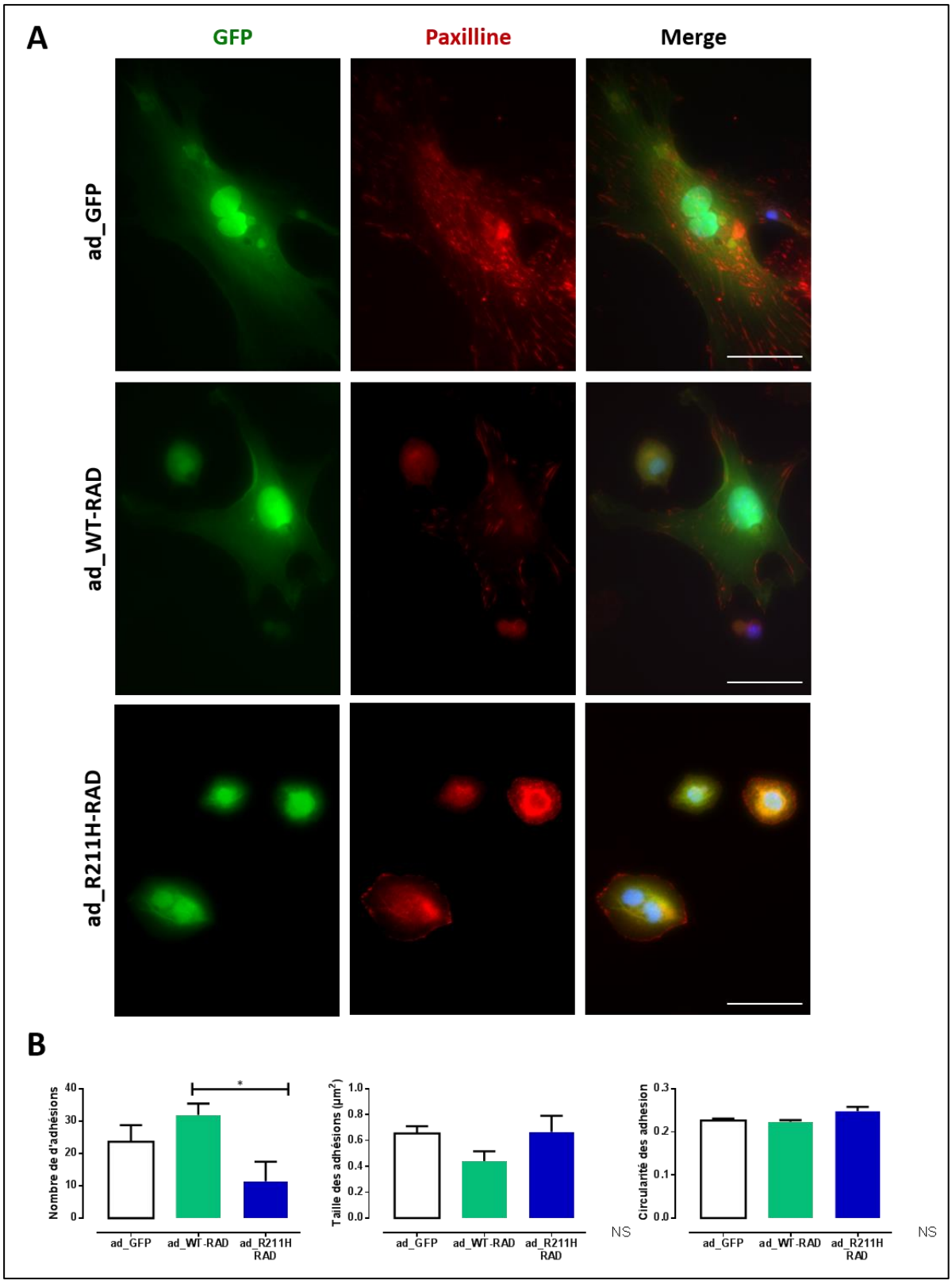


Figure 19 : Les points focaux d'adhésion dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées.

A. Acquisitions en microscopie confocale du marquage Paxilline (rouge) dans des cardiomyocytes infectés avec les 3 adénovirus étudiés (vert). **B.** Quantification du nombre, de la taille et de la circularité des agrégats de Paxilline

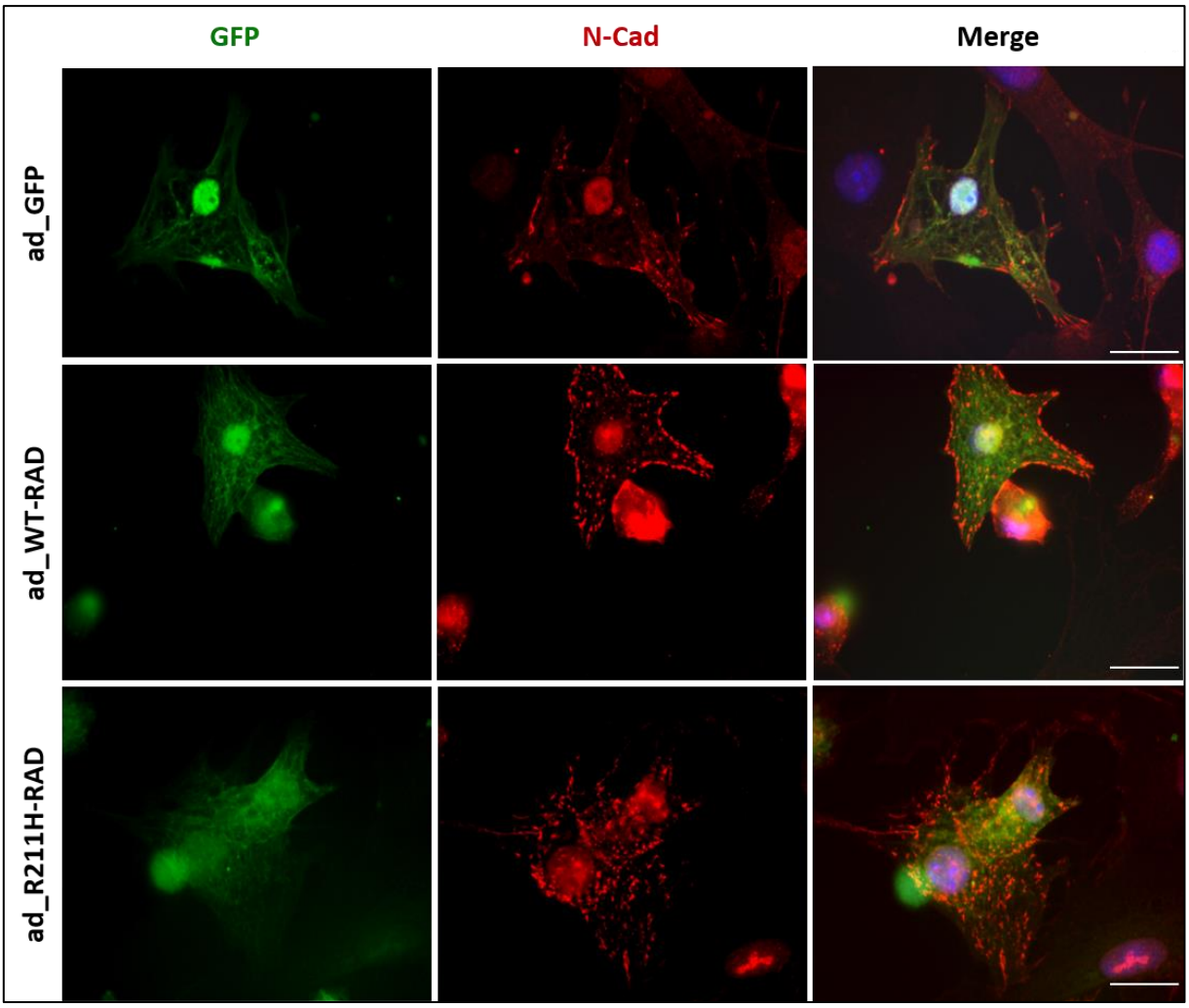


Figure 20 : La N-Cadhérine dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées.

Acquisitions en microscopie confocale du marquage de la N-Cadhérine (rouge) dans et des cardiomyocytes infectés avec les 3 adénovirus étudiés (vert ; barre : 20 µm).

2. Investigation du variant Rad p.R211H dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC :

2.1. Le courant sodique:

Les résultats décrits dans l'article 1 montrent que l'amplitude d'I_{Na} est diminuée significativement dans les cardiomyocytes exprimant le variant Rad p.R211H (BrS). Cette diminution a été observée dans tous les clones dérivés du patient atteint du syndrome de Brugada et porteur du variant. Néanmoins quelques différences ont été observées entre les lignées de ce patient. Ainsi, on constate un décalage de la courbe d'activation d'I_{Na} vers les potentiels plus négatifs pour le clone 2 par rapport aux autres clones et aux cellules contrôles, même si cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 21A). Aucune différence n'est observée pour la courbe d'inactivation à l'état stable, la levée d'inactivation et les cinétiques d'inactivation entre les clones BrS (Figure 21 B,C,D).

Par ailleurs, il a été rapporté dans l'article que le courant sodique persistant, I_{Nap}, augmente dans les 3 clones BrS, avec une amplitude maximale de courant autour de -20 mV. Pour le mettre en évidence les variations de densité du courant sodique persistent en fonction des variantions de potentiel, un protocole de rampe de stimulation qui va de -120 mV et qui se dépolarise graduellement jusqu'à atteindre un potentiel de +40 mV pendant 1 seconde est imposé. En plus de la composante mesurée à -20 mV, une autre composante de courant persistant, avec une amplitude maximale autour de -40 mV, est significativement plus grande dans les cellules du patient par rapport aux cardiomyocytes contrôles au même potentiel (Figure 22 A). Ce courant a déjà été observé dans des conditions physiologiques et est connu sous le nom de « courant de fenêtre ». Il correspond à la population de canaux sodiques qui restent ouverts pour la gamme de potentiels auxquels les courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable se croisent. Ce courant de fenêtre augmente plus fréquemment dans les cardiomyocytes du clone 2 BrS (60% des cellules), le même qui présente le décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. De plus les cardiomyocytes qui présentent cette composante à -40 mV, présentent aussi une augmentation du courant sodique persistent à -20 mV, mais celle de -40 mV est plus ample (figure 22 B). Afin de mieux caractériser ce courant TTX sensible, des sauts de potentiel de plus en plus dépolarisés et d'une durée de 350 ms, précédés par une pré-stimulation à +50 mV (durée de 100 ms), ont

été imposés aux cellules. Le saut de potentiel à +50 mV, très proche du potentiel d'équilibre des ions Na^+, permet d'activer tous les canaux sans générer de courant, permettant ainsi un meilleur contrôle du potentiel. La courbe courant/potentiel qui en résulte montre que les cellules contrôles présentent simplement une composante entrante à -40 mV d'une densité moyenne de 0,1 pA/pF. Les courants enregistrés sur les cardiomyocytes dérivés des clones 1 et 3 des lignées BrS, montrent une composante entrante unique alors que les cardiomyocytes dérivés du clone 2 montre deux composantes entrantes distinctes (figure 22 C)

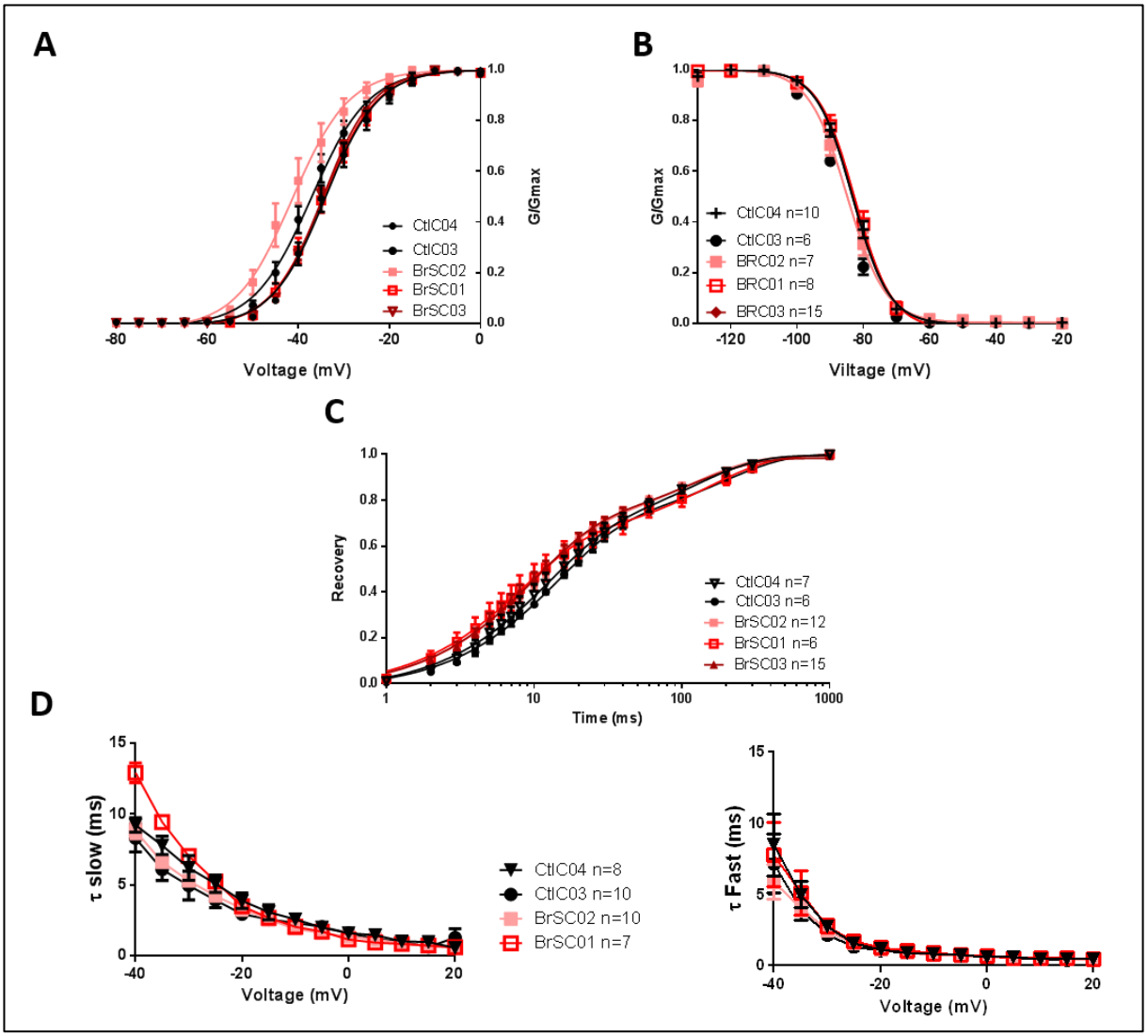


*Figure 21 : Paramètres du courant I_{Na} dans les cardiomyocytes dérivés de cellules **iPS-**.*

A. Courbes d'activation des 3 clones dérivés du patient porteur du variant Rad p.R211H (BrSC01, BrSC02, BrSC03 ; rose et rouge) et du patient contrôle (CtlC03, CtlC04, noir). **B.** Courbes d'inactivation. **C.** Levée d'inactivation d'I_{Na}. **D.** Cinétiques d'inactivation lentes et rapides d'I_{Na} dans 5 lignées cellulaires étudiées.

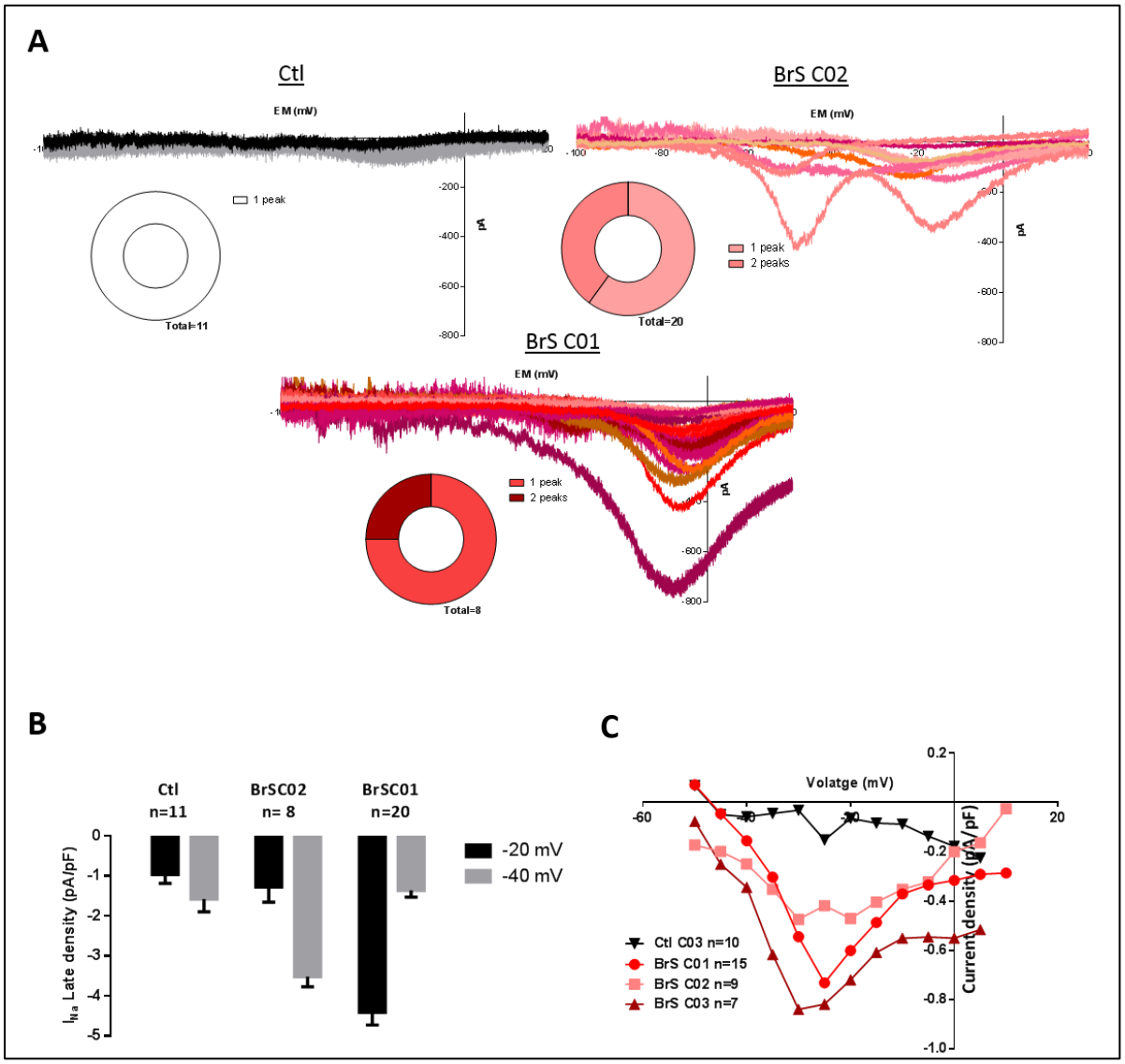


Figure 22 : Le courant sodique persistant I_{NaP} dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.

A. Traces du courant sodique I_{NaP} par cellule pour chaque cardiomyocyte et pour chaque clone (Ctl en noir, BrS C01 rouge, BrS C02 en rose) avec les proportions de cellules qui présentent 1 ou 2 pics en insert. **B.** Densité des courants TTX sensibles mesurés à -20 et -40 mV. **C** courbe IV du courant I_{NaP} par clone.

2.2. Localisation subcellulaire de Rad dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC

La localisation de Rad change en fonction des divers rôles qu'elle joue dans la signalisation intracellulaire. Rad se localise dans le noyau lorsqu'elle interagit avec des facteurs de transcription, au niveau du cytosquelette quand elle régule Rho-associated protein kinase (ROCK) et sous la membrane plasmique lorsqu'elle agit sur les canaux calciques de type L. Dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC de l'individu contrôle, le marquage de Rad révèle une distribution subcellulaire fidèle à celle décrite dans la littérature, le marquage est diffus au niveau du cytosol et des fibres du cytosquelette et plus fort dans le noyau et dans la zone sous-membranaire. Le même marquage a été effectué sur les cardiomyocytes dérivés d'iPSC du patient porteur du variant p.R211H, et dans ces cellules Rad se localise majoritairement autour du noyau en amas filamenteux (Figure 23 A).

Afin de déterminer l'origine de cette localisation particulière de Rad dans les cardiomyocytes exprimant le variant, une étude biochimique de localisation par compartiment cellulaire est en cours. Pour ce faire, des fractionnements cytosol/noyau ont été effectués et comparés aux extraits totaux des protéines issues des cardiomyocytes de chaque individu. Les résultats préliminaires montrent que dans les échantillons totaux, Rad semble présente sous deux formes dont les masses sont de 45 kDa et 35 kDa dans les deux conditions. Rad semble plus exprimée dans la fraction cytosolique que dans la fraction nucléaire des cardiomyocytes contrôles dans laquelle on ne détecte que l'isoforme de 45 kDa. Dans les cardiomyocytes exprimant le variant, Rad semble exprimée dans la fraction cytosolique mais aussi dans la fraction nucléaire de manière plus importante que dans celle des cellules contrôles. En plus de la forme de 45 kDa, l'isoforme de 35 kDa est détectée dans la fraction nucléaire des cardiomyocytes exprimant le variant. Une quantification de la protéine Nav1.5 a montré que ce canal semble moins exprimé dans les extraits totaux des cardiomyocytes BrS comparé aux contrôles (Ctl). Dans les fractions issues des cardiomyocytes contrôles, Nav1.5 est absent dans les deux compartiments cytosolique et nucléaire, mais de manière intéressante, une petite proportion du canal sodique semble être présente au niveau de la fraction nucléaire des cardiomyocytes BrS (Figure 23 B). La quantification présentée dans la figure est issue de résultats préliminaires, d'autres analyses sont en cours sur un plus grand nombre d'échantillons et de clones afin de confirmer les résultats obtenus

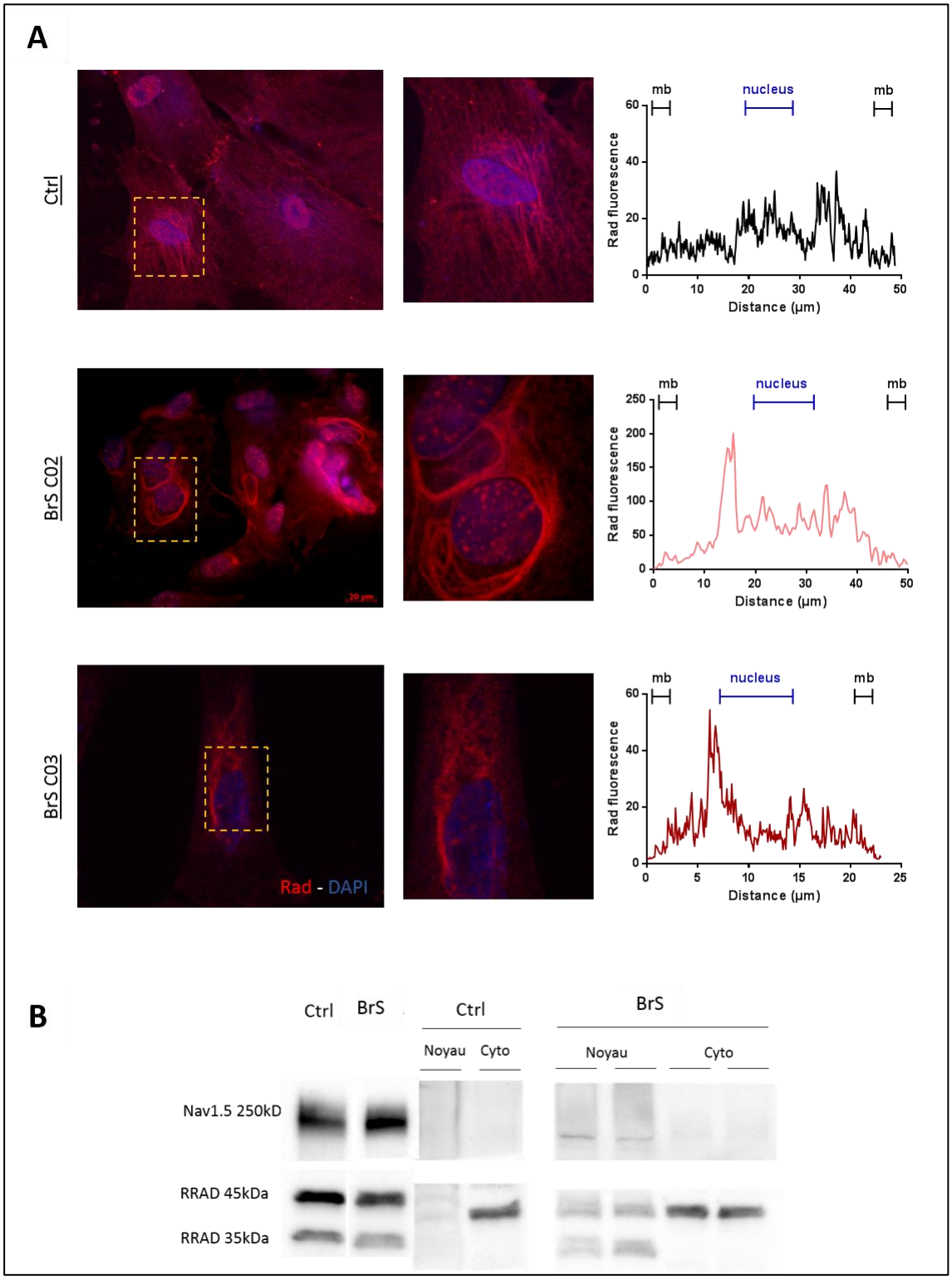


Figure 23 : Localisation subcellulaire de la protéine Rad dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.

A. Acquisition en microscopie confocale d'un exemple de cardiomyocyte par clone étudié (Ctrl, BrS C01 et C03) en rouge et les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu). La distribution de la fluorescence pour chaque canal et pour les cardiomyocyte est jointe à droite de l'image correspondante. **B.** Résultats de la quantification protéique de Rad et de Nav1.5 dans des extraits totaux de protéines des cardiomyocytes contrôles (CTRL) et Rad p.R211H et dans des fractions cytosoliques (C) et nucléaires (N) des mêmes échantillons.

2.3. Les microtubules :

Le réseau de tubuline participe à l'acheminement et à l'adressage des canaux ioniques. Etant donné l'impact de Rad sur l'activité électrique des cardiomyocytes et son implication dans la régulation du cytosquelette, un marquage de la tubuline dans les cardiomyocytes contrôles et BrS a été effectué. Les fibres de tubuline s'organisent en faisceaux longitudinaux dans les cardiomyocytes contrôles, alors qu'en présence du variant p.R211H de Rad, le réseau de tubuline est désorganisé et se distribue en amas diffus autour du noyau et dans le cytosol (Figure 24).

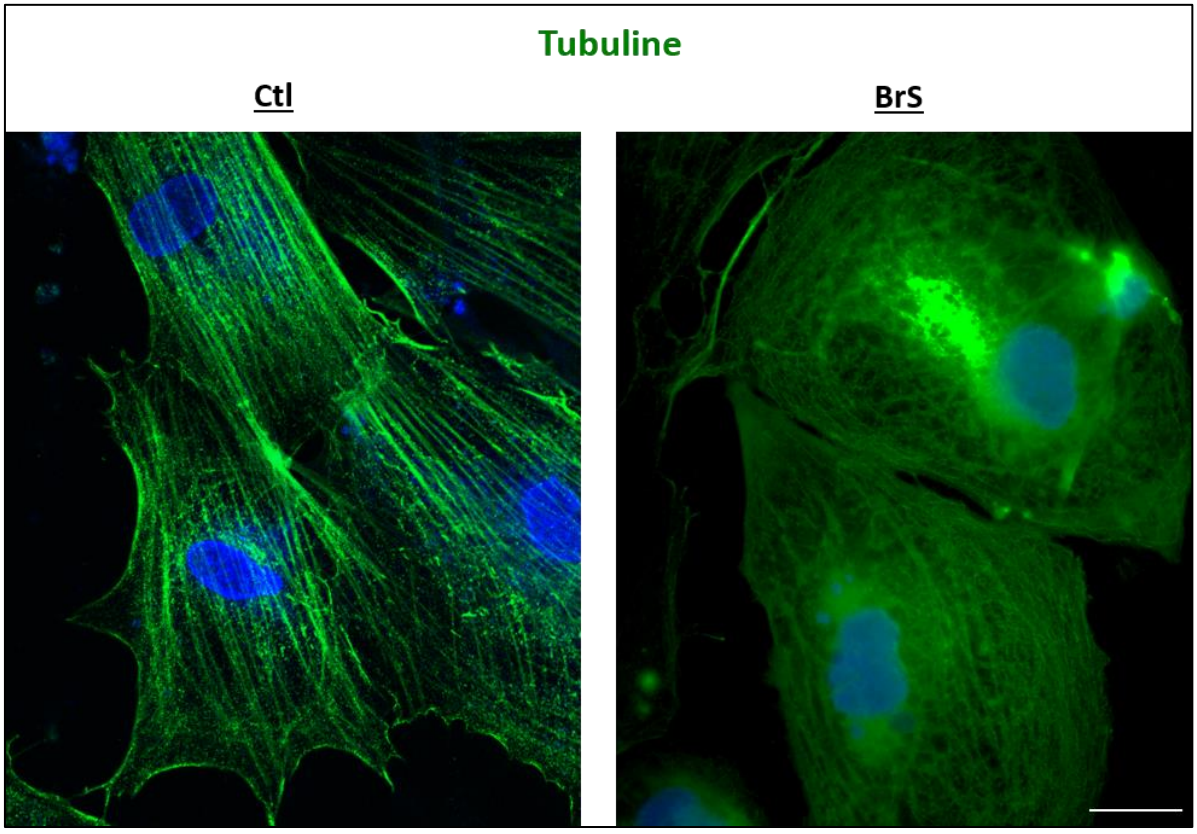


Figure 24 : La tubuline dans les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS.

Acquisitions préliminaires des marquages des fibres de tubuline (vert) dans les cardiomyocytes dérivés du contrôle (Ctrl) et du patient porteur du variant Rad (BrS). Barre : 20 µm

3. Caractérisation de la souris Rad R210H :

3.1. Caractérisation électrophysiologique :

Les électrocardiogrammes de surfaces sont menés sur les deux groupes de souris sauvages (WT) et transgéniques (KI R210H) à l'âge de 15 semaines. Les résultats obtenus ont été analysés et les durées des différentes ondes (P, Q, R, S, T) et des intervalles entres ces ondes (PR, QRS, QTc) ont été mesurées et comparées entre les deux conditions. La figure 25 montre les tracés représentatifs obtenus pour chaque groupe à l'état basal et sous Ajmaline (section A), ainsi que les paramètres mesurés qui montrent une différence significative (section B).

Aucune différence appréciable n'a été relevée entre les deux groupes de souris à l'état basal. Dix minutes après l'administration d'Ajmaline, un allongement des intervalles PR, QRS et QTC a été observé au sein des deux groupes de souris et cet allongement est significativement plus élevé chez les souris portant el variant Rad R210H.

Une exploration endocavitaire par cathétérisme du ventricule droit a été effectuée au sein des eux groupes de souris mais à un âge de 30 semaines. Le protocole consiste à imposer une série de stimulations sur la face endocardique de la paroi ventriculaire afin de provoquer une tachycardie pouvant mener à l'apparition de troubles du rythme cardiaque chez les souris présentant une vulnérabilité électrique. L'induction de cette tachycardie chez les souris sauvages n'a montré aucun évènement arythmique anormal mis à part l'apparition de quelques extrasystoles ventriculaires plus ou moins communes au cours de ce protocole. Pour les souris KI R210H, l'induction de la tachycardie a été très difficile à obtenir montrant des périodes réfractaires plus importantes que celles des souris sauvages, ce qui limite la capacité de la stimulation imposée à induire des troubles du rythme chez ces souris (Tableau 14). Si l'on exclut les souris pour lesquelles la période réfractaire n'a pu être mesurée à la fois en condition contrôle et après injection d'ajmaline, les valeurs de PREV sont :

- 39.3 ± 2.4 ms sous contrôle et 49.0 ± 3.1 ms sous ajmaline ($p< 0.01$ *versus* contrôle) pour les souris sauvages (n = 11) ;
- 36.3 ± 2.0 ms sous contrôle et 54.9 ± 4.2 ms sous ajmaline ($p< 0.001$ *versus* contrôle ; analyse de variance à deux voies complétée par un test de Bonferroni) pour les souris $Rad^{+/R210H}$ (n = 8).

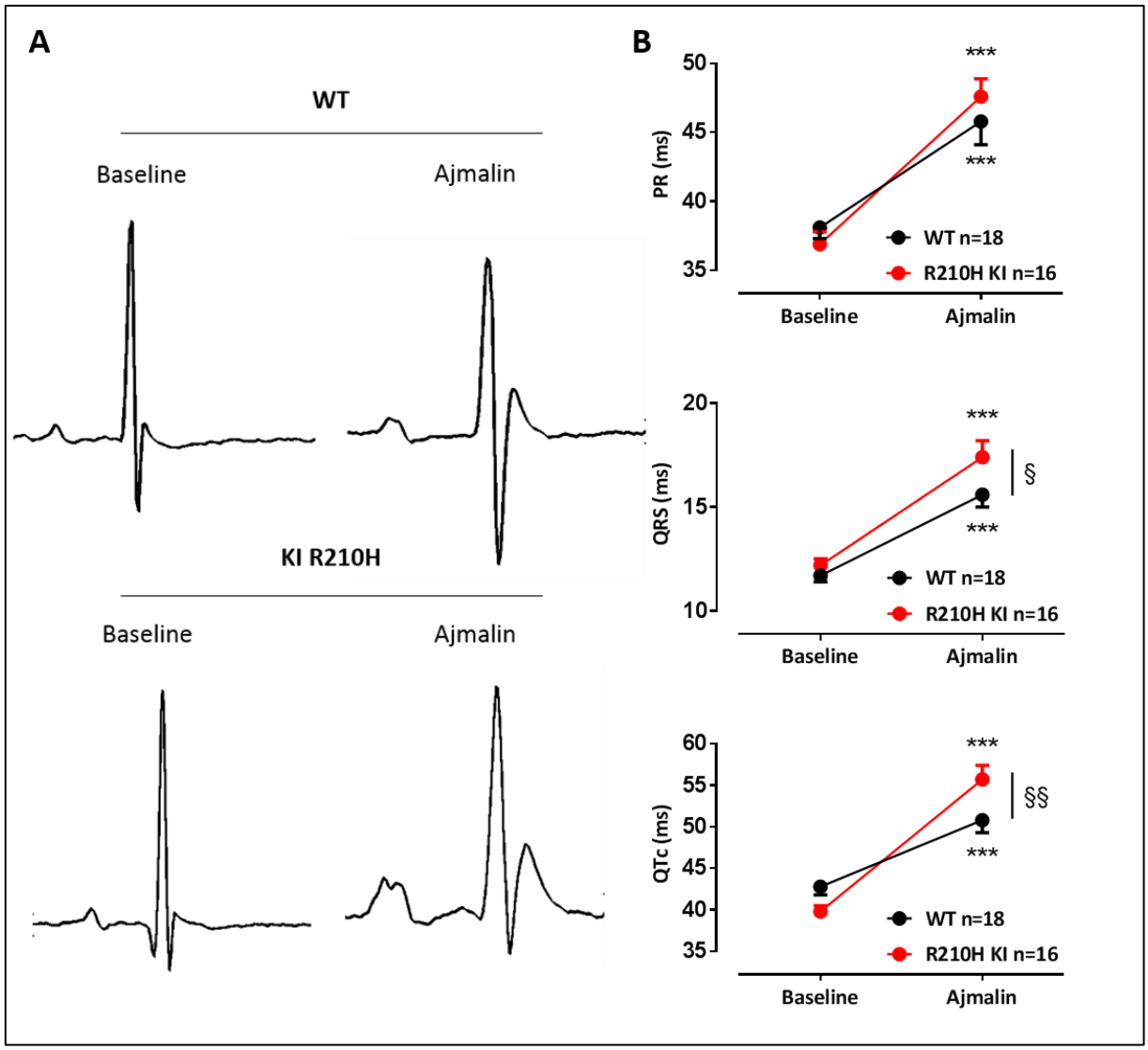


Figure 25 : Caractérisation électrophysiologique des souris KI R210H.

A. Tracés ECG de surface représentatifs de souris WT et KI R210H en état basal puis 10 min après administration d'Ajmalin. **B**. Mesures des durées d'intervalles PR, QRS et QTc pour les deux groupes de souris WT (noir) et KI (rouge) en état basal puis sous Ajmalin.

Tableau 16 : Résultats des expérimentations de stimulation ventriculaire programmée

	PREV (ms)	Souris avec ESV spontanées	Souris avec ESV déclenchées	Souris avec TV déclenchées
Souris Rad$^{+/+}$				
Contrôle	40.0 ± 2.1 (13)	5/14	1/13	0/13
Ajmaline	49.0 ± 3.1 (11)	3/12	0/11	0/11
Souris Rad$^{+/R210H}$				
Contrôle	34.3 ± 1.5 (13)*	8/13	2/13	1/13
Ajmaline	54.9 ± 4.2 (8)	2/11	0/8	0/8

Le nombre de souris par groupe (indiqué entre parenthèses pour la PREV) varie parce toutes les souris n'ont pu être stimulées efficacement et parce que des souris sont mortes après l'injection d'ajmaline. Acronymes : PREV, période réfractaire effective ventriculaire ; ESV, extrasystole ventriculaire ; TV, tachycardie ventriculaire. *, p< 0.05 *versus* souris Rad$^{+/+}$ (test *t* de Student).

3.2. Distribution de l'expression de la protéine Rad et Nav1.5 dans les cœurs des souris WT et KI R210H :

La quantification de la protéine Rad et Nav1.5 a été effectuée sur la fraction ventriculaire des cœurs de souris WT et KI R210H à l'âge de 15 semaines. Les parois libres des ventricules gauches (LV), des ventricules droits (RV) et des chambres de chasse des RV (RVOT) ont été isolées. La figure 26 A montre que Rad est exprimée de manière beaucoup plus importante dans le RVOT que dans les deux autres compartiments ventriculaires chez les deux groupes de souris. Ces traces de Western Blot montrent aussi que dans le RVOT, Nav1.5 présente un profil d'expression inverse à celui montré par Rad et semble au contraire, moins exprimé. Cette quantification a été effectuée sur un plus grand nombre de souris et les résultats obtenus montrent que Rad est 4 fois plus exprimé dans le RVOT que dans les autres compartiments que cela soit pour les souris sauvages ou KI. Par ailleurs aucune différence significative n'a été

observée pour l'expression de Nav1.5 malgré la légère tendance à la diminution dans le RVOT (Figure 26B). Enfin, la mutation p.R210H ne modifie pas les niveaux d'expression de Rad.

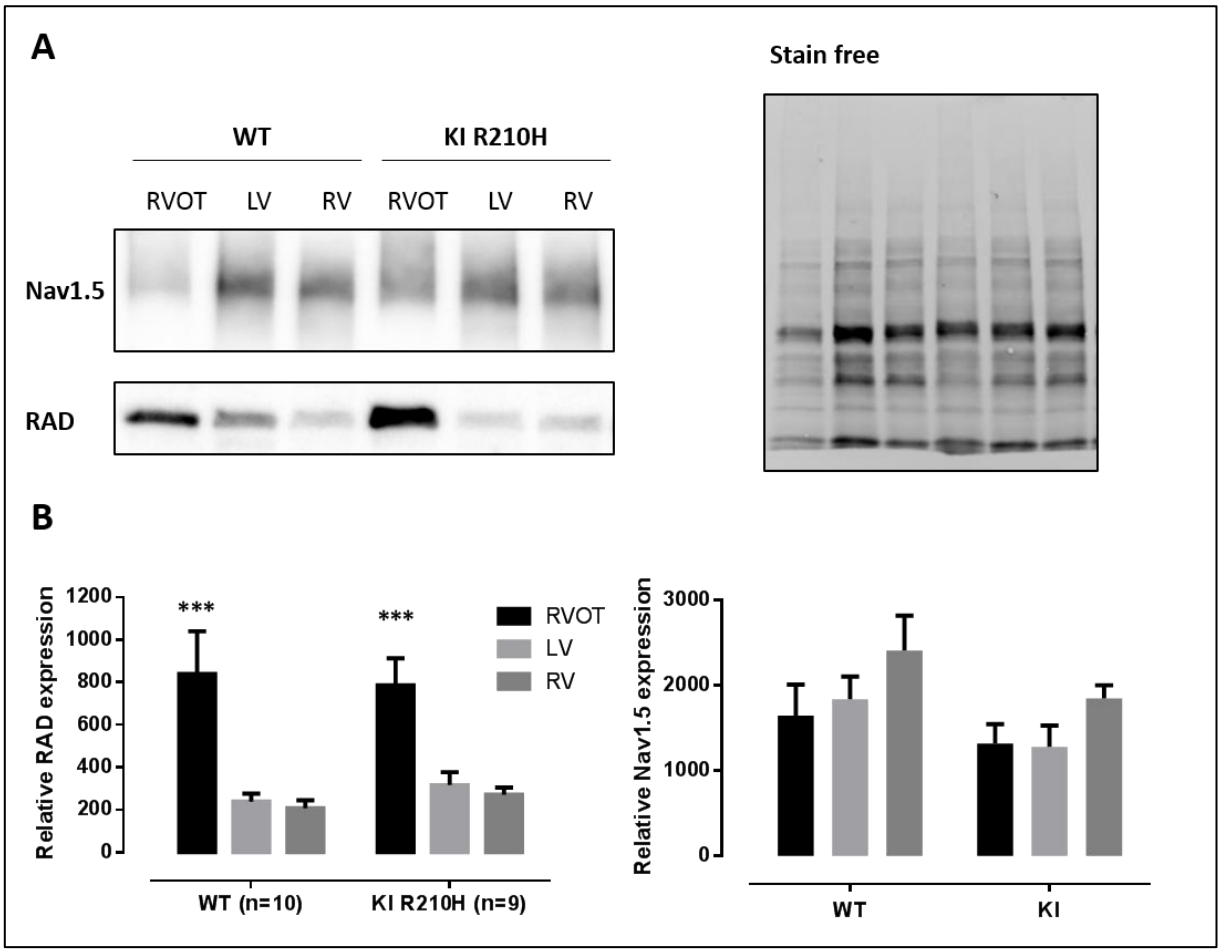


Figure 26 : Variations d'expression protéique de Rad et Nav1.5 dans les cœurs des souris WT et KI R210H

A. Expression de la protéine Rad et Nav1.5 dans les extraits protéiques des parois libres du RV, LV et RVOT des souris provenant des deux génotypes WT et KI R210H. **B.** Quantification de l'expression des deux protéines dans les mêmes compartiments sur un plus grand nombre de souris (WT n=10 et KI R210H n=9). ***p<0.001, ANOVA deux voies.

3.3. Expression de la protéine Rad en fonction de l'expression de la protéine Nav1.5 :

Etant donné les résultats de Western Blot obtenus dans les extraits protéiques des souris sauvages et KI R210H, une quantification de la protéine Rad a été effectuée dans un modèle de souris présentant une invalidation (knockout) hétérozygote du gène Scn5a ($Scn5a^{+/-}$). Ce modèle déjà présent au sein du laboratoire a montré des troubles de la conduction et une expansion de la fibrose cardiaque qui s'aggrave avec l'âge. Ce modèle a permis de mesurer l'effet de l'absence de 50% des protéines Nav1.5 sur l'expression de Rad au cours du vieillissement. Une quantification du CTGF (Connective Tissue Growth Factor), marqueur de l'activation du remodelage fibrotique, a été effectuée sur les mêmes échantillons.

Les résultats obtenus montrent que Rad et CTGF conservent le même degré d'expression quel que soit l'âge des souris sauvages (à 10, 30, 45 et 60 semaines). Chez les souris $Scn5a^{+/-}$, l'expression de Rad augmente graduellement avec l'âge et atteint une augmentation significative chez les souris de 60 semaines. Cette augmentation est corrélée à celle du CTGF qui présente un profil d'expression similaire mais qui se déclare plus tôt, à l'âge de 45 semaines (Figure 27).

3.4. Caractérisation de la structure cardiaque chez les souris KI R210H :

Les résultats de l'étude de l'architecture du cytosquelette des cardiomyocytes exprimant le variant Rad p.R211H ont montré des perturbations de la distribution d'éléments importants impliqués dans l'intégrité de la morphologie cellulaire. La conséquence globale de cette perturbation conduit à l'arrondissement des cellules dus à un manque de points focaux d'adhésion et une délocalisation du cytosquelette d'actine. Ce phénotype peut avoir une projection au niveau de l'architecture tissulaire des ventricules et spécifiquement dans les zones où Rad est le plus exprimé. Afin de mettre en évidence ces perturbations éventuelles sur la morphologie globale des cœurs des souris KI 210H et leur teneur en fibrose cardiaque, des colorations Hématoxyline Eosine et Rouge Picrosirius ont été réalisées sur des coupes histologiques de cœurs issus de souris WT et KI.

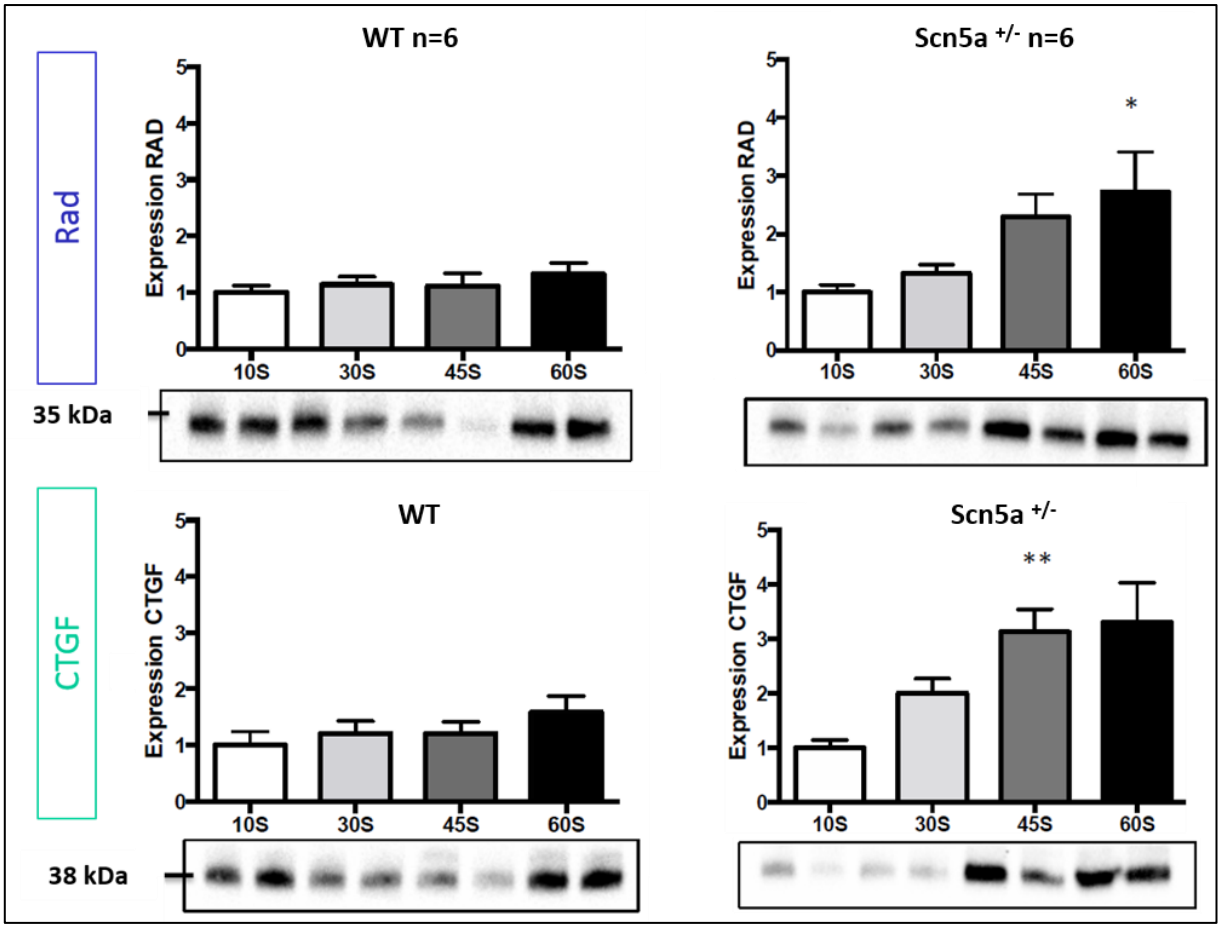


Figure 27 : Expression de Rad et CTGF dans les cœurs des souris sauvages et Scn5a$^{+/-}$

Variations de l'expression de Rad et CTGF dans les extraits protéiques de ventricules totaux des souris WT (sauvages, n=6) et Scn5a$^{+/-}$ (n=6) à l'âge de 10, 30, 45 et 60 semaines. *p<0.05, **p<0.01. ANOVA une voie.

Les coupes de cœurs colorées à l'hématoxyline – Eosine (HE) ne montrent pas de perturbation de la structure globale des ventricules entre les deux groupes de souris. Les coupes colorées au rouge picrosirius effectuées sur les mêmes cœurs que celles colorées à l'HE montrent une densité des fibres de fibrose plus importantes dans les ventricules droits des cœurs des souris KI R210H comparé aux cœurs des souris sauvages (Figure 28A). Un seuillage des images des coupes colorées au rouge picrosirius acquises au microscope avec un filtre polariseur a pu permettre de mettre en évidence des amas fibreux rouges (Cluster) plus denses que le reste du tissu ventriculaire. Le même seuillage a été appliqué dans deux conditions et le pourcentage de surface que ces amas fibreux occupent au sein du ventricule droit en général et du RVOT en particulier, ainsi que leur taille ont été mesurés. Les souris KI R210H présentent plus d'amas fibreux avec une distribution interstitielle plus présente que

celle observée chez les souris WT avec une surface occupée sur la totalité du VD ainsi que dans le RVOT qui est significativement plus importante que celle occupée par la fibrose observée chez les souris sauvages. De plus la taille moyenne de ces amas est significativement plus grande que celle des fibres observée chez les souris sauvages (Figure 28B).

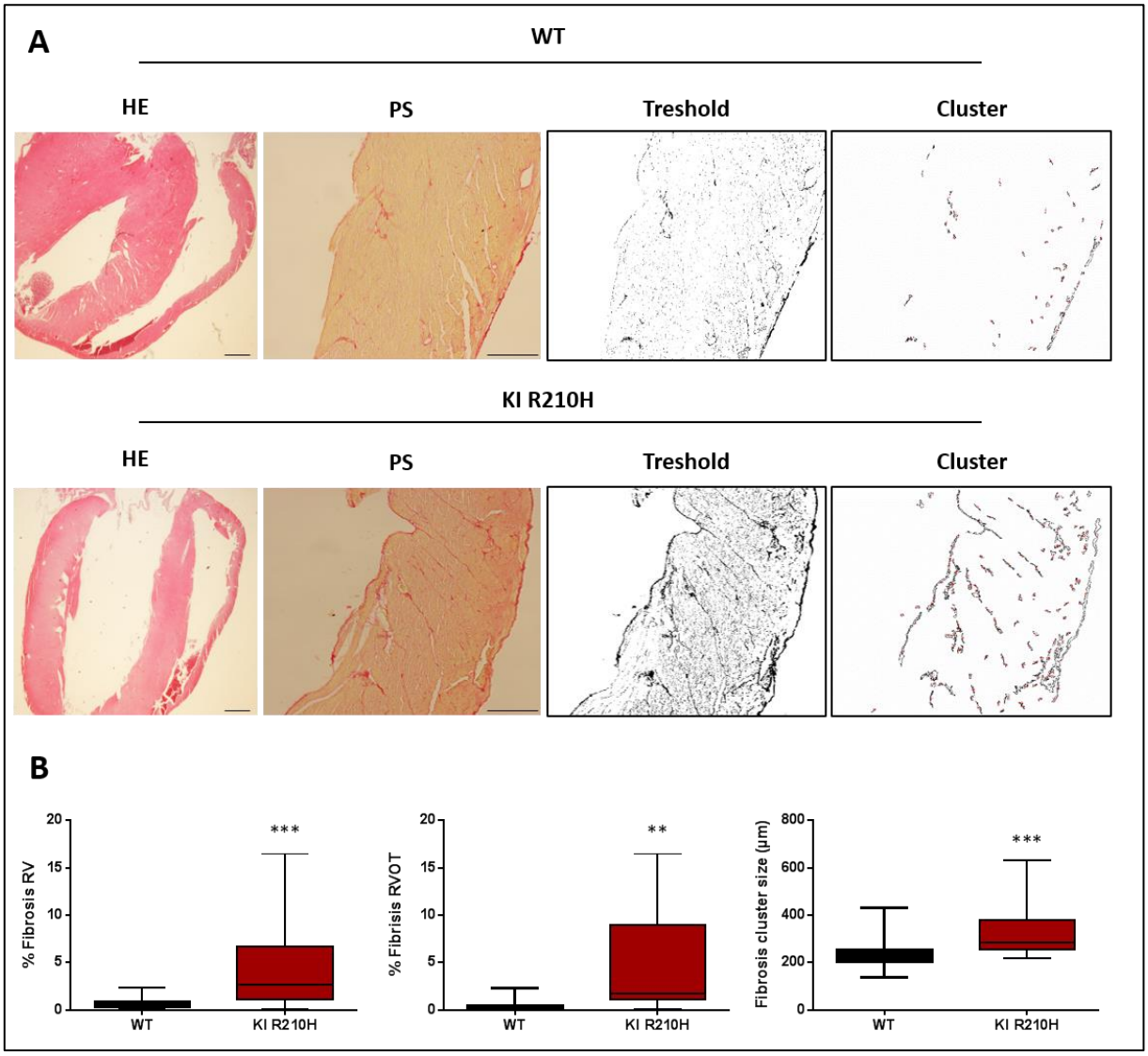


Figure 28 : Etude de la fibrose cardiaque au sein des cœurs de souris WT et KI R210H.

A. Images représentatives de coupes de cœur de souris WT et KI R210H colorées à l'Hématoxyline-Eosine (HE ; Barre : 500 µm), au rouge picrosirius (Barre : 100 µm) ainsi que les résultats de seuillage et la détection correspondante (Threshold et Cluster, respectivement). **B.** Mesure du rapport de surface occupé par la fibrose au sein du ventricule droit (RV), de sa chambre de chasse (RVOT) et la taille des amas de fibrose détectés dans les deux conditions WT (n=3) et KI R210H (n=3).

Discussion complémentaire et perspectives

1. Discussion :

L'intégrité de l'activité électrique cardiaque repose sur la fonction de plusieurs acteurs dont l'activité synergique aboutit à une propagation électrique et un couplage excitation-contraction efficaces. Cette activité synergique dépend de cascades de régulation activées au cours de l'excitation du cardiomyocyte. Les acteurs principaux de cette fonction sont les canaux ioniques responsables des échanges ioniques transmembranaires visant à réguler le potentiel de membrane. Les connexines, ainsi que l'ensemble du connexome (jonctions *gap*, jonctions serrées et desmosomes), jouent un rôle clé dans la propagation de l'impulsion électrique d'une cellule cardiaque à une autre. Le troisième élément essentiel au couplage électromécanique cardiaque est la machinerie calcique intracellulaire qui regroupe les compartiments calciques mais aussi le sarcomère avec l'ensemble des éléments du cytosquelette et leurs protéines régulatrices [Wagner et al., 2015 ; Bers et al., 2013 ; Leo-Macias., 2017]. Dans un second plan, on distingue les sous-unités régulatrices de ces canaux qui font partie de leurs complexes macromoléculaires et qui sont généralement essentielles à leur assemblage, ancrage et stabilité à la membrane plasmique [Basoni et al., 2015 ; O'Malley., 2015 ; Compiglio et al., 2016]. Ces sous-unités régulatrices semblent avoir d'autres rôles sur l'activité même des canaux, comme celui de moduler leurs propriétés d'activation et d'inactivation, mais aussi dans des fonctions du cardiomyocyte indépendamment de l'activité électrique, telles que la participarion à la régulation transcriptionnelle ou encore l'implication dans l'adhesion et la migration cellulaire [Patel et al., 2015 ; Rima et al., 2016]. En troisième position viennent les protéines régulatrices de l'activité des canaux ioniques qui appartiennent à d'autres complexes protéiques impliqués dans d'autres fonctions cellulaires (Pitt et al., 2016 ; Abriel et al., 2015 ; Gavillet et al., 2006).

Les troubles de l'activité électrique cardiaque peuvent mettre en jeu n'importe lequel de ces éléments et la liste exhaustive de toutes les protéines impliquées dans une régulation aussi fine est longue. Afin de discriminer l'implication d'un gène dans le phénotype d'une pathologie donnée, la stratégie repose sur une approche gène / candidat. Cette approche consiste a identifier des variants génétiques sur le gène codant pour la protéine ayant le plus d'implication fonctionnelle dans la pathologie, puis de procéder par élimination en allant vers

le gène codant pour le protéine la moins susceptible d'induire le phénotype observé. Cette stratégie se trouve limitée lorsque tous les acteurs ne sont pas connus ou que leurs fonctions ont été partiellement décrites, ce qui remet en cause le degré de leur implication.

C'est dans la logique de ce raisonnement que l'étude génétique et fonctionnelle de l'implication de la protéine Rad GTPase dans le syndrome de Brugada a été menée. L'étude a débuté après l'investigation clinique d'une nouvelle famille rapportant 5 cas positifs pour le syndrome de Brugada après un test Flecainide (sauf le Propositus qui présentait le tracé ECG type spontanément). Après séquençage d'exome des 5 individus, l'application des filtres de ségrégation de variants rares a permis l'identification de 5 gènes potentiellement impliqués dans la manifestation du syndrome de Brugada dans cette famille. Parmi eux, le gène *RRAD* a montré la meilleure pénétrance et co-ségrégation avec le phénotype. Bien que *RRAD* présentait la meilleure susceptibilité génétique d'induire le phénotype des patients, d'un point de vue fonctionnel, la protéine était peu connue dans le contexte cardiovasculaire.

Dans ce contexte, l'étude fonctionnelle a débuté par une étape de caractérisation de la protéine sauvage dans un modèle de cardiomyocytes de souris nouveau-nées. Des études de surexpression de la protéine Rad dans des systèmes d'expression hétérologues ont montré que Rad et les autres membres de la famille RGK régulent négativement le courant calcique de type L [Puhl et al., 2014 ; Cahng and Colecraft., 2015]. Les mécanismes par lesquels les différents membres de cette famille produisent cet effet sur les canaux calciques de type L passent soit par une interaction directe avec l'extrémité C-terminale du canal, soit par une interaction avec sa sous unité β2 régulatrice (Yang et al., 2012). Nos résultats montrent que la surexpression de Rad sous sa forme sauvage provoque une diminution de la densité du courant calcique de type L mais aussi une diminution aussi importante du courant sodique, ce qui n'a pas encore été décrit dans littérature pour cette protéine. La probabilité pour que l'effet de Rad sur le courant sodique passe par une interaction avec la sous-unité β du canal Nav1.5 reste à vérifier mais semble peu probable étant donné le peu d'homologie qu'elle partage avec la sous-unité β2calcique [Hanlon and Wallace., 2002]. Par ailleurs, aucune étude ne montre d'effets d'autres membres de la famille RGK sur ce courant. Ces résultats ont permis de vérifier que Rad avait le même effet sur le courant calcique de type L dans les cardiomyocyte que celui qu'il exerce dans les systèmes d'expression hétérologue, mais son effet sur le courant sodique est d'autant plus intéressant étant donné le rôle central joué par

ce canal et ses protéines partenaires dans le syndrome de Brugada [Wilde et al., 2011]. La protéine portant le variant Rad p.R211H a été surexprimée de la même façon et l'absence d'effets additionnels par rapport à l'effet induit par la forme sauvage peut être due au fait que la surexpression sature déjà le système et exerce l'effet maximal que Rad pourrait provoquer.

Nous nous sommes donc orientés vers un système d'expression endogène de la protéine sauvage et mutée qui est la reprogrammation des cellules somatiques des individus de la famille (le propositus et son frère non porteur du variant) en cellules souches pluripotentes induites, puis leur différenciation en cardiomyocytes. Ainsi, nous avons pu investiguer l'impact du variant p.R211H sur la fonction de Rad dans des cardiomyocytes humains sans artéfact de surexpression. Les résultats issus de la caractérisation électrophysiologique des cardiomyocytes exprimants le variant ont montré les mêmes effets sur les courants dépolarisants I_{Na} et I_{CaL} que ceux observés dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées surexprimants la protéine Rad sauvage. L'impact de cette diminution a été visualisé sur les potentiels d'action cardiaques enregistrés sur ces cellules et en plus de la diminution de la pente de dépolarisation des PA des cardiomyocytes portant le variant, un allongement de leur durée et une augmentation de l'incidence d'arythmies telles que les EAD a été observée. Un tel phénotype est peu commun pour le syndrome de Brugada et ressemble plus à ce qu'on peut observer pour le syndrome du QT Long dans lequel un allongement de la durée du PA aves l'apparition d'EAD serait plus plausible [Rochetti et al., 2017 ; Stilliano et al., 2017]. Néanmoins, des résultats similaires sont de plus en plus observés dans des études de caractérisation de variants supposés à l'origine du syndrome de Brugada dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC. Au sein de notre laboratoire, ce phénomène a été observé dans 3 lignées cellulaires exprimant 3 variants différents liés au syndrome de Brugada (figure 29). Et au sein du laboratoire de Dan Roden, un variant lié au syndrome de Brugada sur le gène TBX 5 semble induire des effets similaires dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC [Bersell KR, Heart Rhythm 2016 ; 13 (5) suppl :S9]. Nous avons essayé d'élucider l'origine de cet allongement de PA en mesurant le courant sodique persistent dans ces cellules et une augmentation systématique de ce courant a été observé dans les 3 lignées dérivées du patient porteur du variant Rad p.R211H mais aussi dans les autres lignées de cardiomyocytes dérivés d'iPSC exprimant d'autres variants liés au syndrome de Brugada. Ces observations ont déjà été décrites dans le cadre de la mutation *SCN5A* p.Ins1798D qui provoque un syndrome

combinant le phénotype Brugada et le phénotype QT long (Overlap Syndrome) [Davis et al., 2012 ; Portero et- al., 2017]. Néanmoins, aucune augmentation de l'intervalle QTc n'a été relevée sur les paramètres ECG des 5 patients de la famille. Ce phénotype peut aussi être dû à l'immaturité électrophysiologique et structurale des cardiomyocytes dérivés d'iPSC qui en la présence d'un élément perturbateur tel qu'une protéine mutée va être exacerbée.

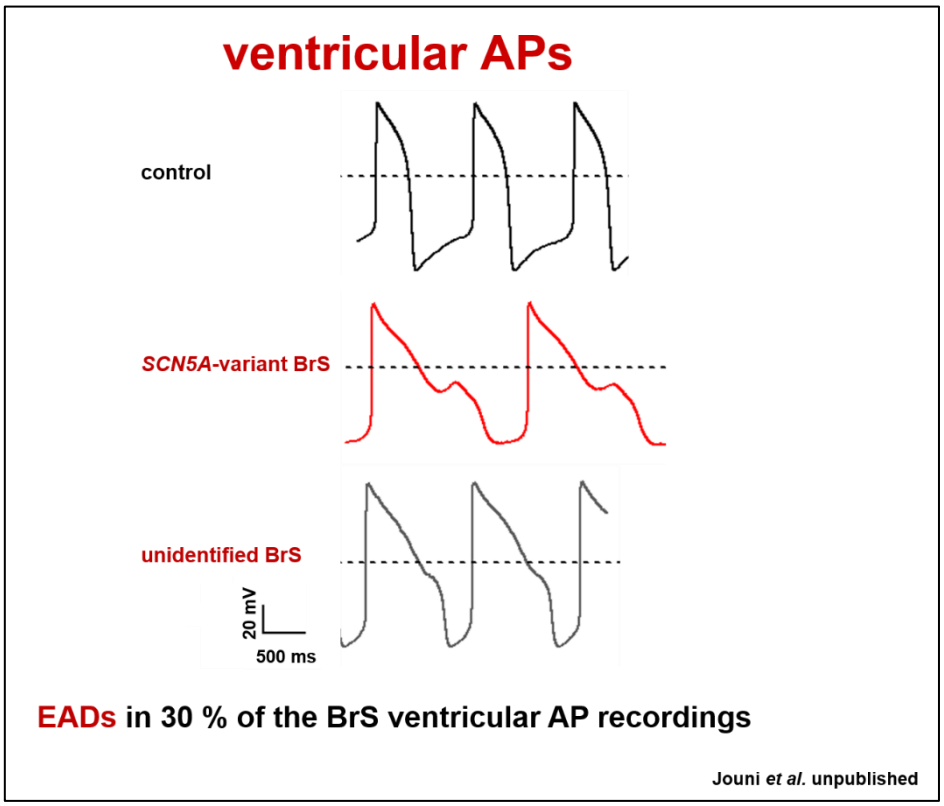


Figure 29 : Potentiels d'actions des CM-iPSC différenciés de patients porteurs d'autres variants génétiques liés au syndrome de Brugada (BrS). AP, action potential; EADs, early afterdepolarizations (ou post-dépolarisations précoces).

En plus de son implication dans la régulation de l'homéostasie calcique, Rad GTPase n'en reste pas moins une protéine G monomérique et est impliquées dans des cascades de signalisations régulant la morphologie cellulaire [Mahalakshmi et al., 2007 ; Zhu et al., 1996]. Une analyse de la structure du cytosquelette des deux modèles cellulaires utilisés dans cette étude a permis de montrer que la surexpression de la protéine sauvage dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées perturbe le cytosquelette d'actine et que ce phénomène est exacerbé dans les cardiomyocytes infectés avec l'adénovirus portant la séquence Rad p.R211H. Des résultats comparables ont été obtenus pour les cardiomyocytes

dérivés d'iPSC exprimant le variant. En plus de la corticalisation du cytosquelette d'actine, une rétractation des points focaux d'adhésion a été observée avec une diminution de leur nombre. Ce phénotype peut être expliqué par l'implication de Rad dans les voies de signalisation régulant le cytosquelette d'actine. Rad interagit physiquement avec ROCK et interfère dans la voie Rho/ROCK, voie majeure de la polymérisation des fibres d'actine. La régulation de cette voie ubiquitaire a été liée à la fonction de Rad dans une étude montrant une augmentation locale de l'expression de Rad après une lésion vasculaire réalisée sur des carotides de rats. Lorsque ces mêmes animaux étaient injectés avec un adénovirus codant pour la protéine Rad, une diminution du remodelage néo-intimal induit était observée. L'investigation au niveau cellulaire a permis de montrer que la surexpression de Rad dans les cellules musculaires lisses isolées mises en culture diminuait leurs capacités d'adhésion et de migration. La surexpression du dominant négatif Rad p.S105N dans ces mêmes cellules inversait le phénotype, ce qui confirme l'implication de Rad dans le remodelage cellulaire observé (Fu et al 2005). Le mécanisme moléculaire de cette régulation a été montré par Ward et ses collaborateurs pour Rad et Gem dans différents types cellulaires, dans lesquels ils montrent une interaction protéique entre Rad et ROCKβ et Gem et ROKα (Ward et al., 2002). Une étude menée sur une autre protéine de la famille RGK, la protéine Ges, majoritairement exprimée dans les cellules endothéliales, montre que lorsque Ges est surexprimée, elle régule négativement le phénomène de « sprouting » des cellules, phénomène qui dépend du remodelage du cytosquelette d'actine [Pan et al., 2000].

La perturbation du cytosquelette des cardiomyocytes exprimant le variant Rad p.R211H inclut aussi une altération des fibres de tubuline et de la localisation de la troponine I. Outre leur rôle dans l'intégrité de la morphologie des cardiomyocytes, ces protéines jouent un rôle clé dans le couplage excitation-contraction. En effet la troponine I fait partie du sarcomère et se trouve à l'interface de l'interaction des fibres d'actine et de myosine au cours de la contraction du sarcomère [Kumar et al., 2015 ; Racca., 2016]. Les microtubules sont responsables de l'adressage des canaux ioniques au sein des cardiomyocytes et une dépolymérisation des microtubules provoque une diminution drastique du courant sodique [Casini et al., 2010]. La localisation subcellulaire de Rad, qui est présent dans le noyau et en interaction avec le cytosquelette, change dans les cardiomyocytes exprimant le variant vers une localisation majoritairement autour du noyau. Cette modification peut être due à une

modification de son interaction avec la protéine 14-3-3 ou la Calmoduline qui ont été décrites comme régulant sa position dans la cellule [Béguin et ., 2006]. De plus, il semblerait qu'une petite fraction de canaux sodiques suit cette localisation nucléaire, ce qui pourrait expliquer partiellement la diminution du courant sodique dans ces cellules.

L'effet du variant Rad p.R211H sur les points focaux d'adhésion peut être la simple conséquence de la perturbation du cytosquelette d'actine, vu que les points focaux sont en continuité avec les fibres d'actine [Case and Waterman., 2005]. D'autres parts, il est connu que la maturation et l'assemblage des points focaux d'adhésion dépend de l'interaction des différents composants de ce complexe (Vinculine, Thaline, Paxillune, Intégrine….) [Burridge 2017]. La vinculine et la paxilline doivent être phosphorylées pour interagir avec leurs partenaires, et cette phosphorylation est dépendante de la FAK (Focal Adhesion Kinase) [Schaller 1992]. L'activité de cette kinase est amorcée par le calcium intracellulaire : si sa concentration diminue, l'activité de la kinase diminue aussi (Easleyet al., 2008). Par conséquent, une autre hypothèse voudrait que la diminution du calcium intracellulaire induite par l'effet de Rad sur les canaux calciques diminue l'activité de la FAK, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus. De plus, une étude récente a montré que deux variants détectés sur le gène codant pour la vinculine était associé à l'apparition du syndrome de Brugada chez des patients porteurs de mutations sur *SCN5A* [Cheng et al. 2017 ; Cheng et al., 2017]. Par ailleurs, la sous-unité β du canal sodique a été identifiée comme une protéine faisant partie du complexe d'adhésion des cellules métastatiques du cancer du sein [Chioni et al., 2009]. Donc on pourrait formuler l'hypothèse que si Rad provoque la diminution du courant sodique en sequestrant la sous-unité β hors de son complexe macromoléculaire, cela pourrait aussi produire une perturbation de l'organisation des points focaux d'adhésion.

Considérés dans leur ensemble, les éléments affectés par le variant Rad p.R211H participent à l'intégrité structurale et électrique des cardiomyocytes. Le phénotype électrique peut être dû à un effet direct de la protéine sur l'activité des canaux ioniques, comme il peut être dû au remodelage du cytosquelette qui pourrait perturber leur adressage. De la même façon, étant donné l'importance du rôle joué par le calcium et le sodium dans la transcription de gènes, la régulation de voies de signalisations du développement ou des voies apoptotiques, les troubles électriques peuvent aussi être à l'origine des troubles structuraux observés [Gabellini 2004 ; Winslow et al. 2016 ; Humeau et al., 2017].

Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC ont permis d'étudier l'impact du variant Rad p.R211H et de comparer les résultats à ceux obtenus sur des cardiomyocytes contrôles dérivés à partir de la même famille. Cette lignée de cellules contrôles provient du frère du propositus qui n'est pas atteint du syndrome de Brugada, ne porte pas le variant Rad p.R211H et porte les 4 autres variants candidats écartés lors de l'investigation génétique. Néanmoins, l'absence d'un effet électrophysiologique supplémentaire du variant dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées et l'absence d'une lignée de cardiomyocytes contrôles isogéniques dans laquelle on aurait induit l'expression du variant nous empêche d'affirmer de façon définitive que c'est ce variant qui induit le phénotype observé dans les cardiomyocytes dérivés du propositus, même si c'est fortement probable.

La génération du modèle de souris KI Rad R210H, vise à caractériser les effets du variant sur le plan tissulaire et à l'échelle de l'organe entier, en plus de confirmer l'implication de la protéine Rad dans les troubles du rythme observés chez les patients porteurs du variant. La caractérisation électrophysiologique menée à l'âge de 15 semaines pour l'ECG et de 30 semaines pour l'exploration endocavitaire du ventricule droit a montré une sensibilité accrue à l'administration d'inhibiteurs sodiques au cours de l'ECG chez les souris KI. Les premières études histologiques ont pu montrer une densité de fibrose interstitielle dans le ventricule droit des souris KI plus importante que celle mesurée chez les souris contrôles du même âge. L'étude de l'expression de la protéine Rad dans les parois libres des ventricules gauche, droit et la chambre de chasse du ventricule droit a permis de mettre en évidence une expression de Rad 4 fois supérieure dans le RVOT que dans les autres compartiments étudiés et au sein des deux groupes de souris (WT et KI). De la même manière, l'expression de Rad a été quantifiée dans des extraits issus des compartiments sous-épicardique et sous-endocardique de parois ventriculaires humaines gauches et droites. Les résultats obtenus montrent que Rad est plus exprimée dans le myocarde sous-épicardique que dans le myocarde sous-endocardique. Ce gradient d'expression est opposé à celui de la protéine Nav1.5 qui présente une expression importante dans le feuillet endocardique qui s'affaiblit en allant vers l'épicarde. Par ailleurs, Nav1.5 est moins exprimée dans la chambre de chasse du ventricule droit et une diminution de la densité du courant dans cette région anatomiquement particulière favorise un ralentissement de la conduction. [Remme et al., 2009 ; Boukens et al., 2013].

Le profil d'expression et la fonction de Rad et de Nav1.5 présentent une corrélation négative que ce soit au niveau cardiaque, de par leur distribution tissulaire ou le fait que quand Rad est surexprimé I_{Na} diminue, ou au sein des cellules cancéreuses, dans lesquelles la surexpression de Rad va minimiser leur invasivité et leur prolifération alors que ces propriétés sont exacerbées lorsqu'I_{Na} augmente [Besson et al., 2015 ; Roger et al., 2015]. Ces observations laissent supposer que ces deux protéines font partie d'un même réseau de régulation.

Si l'on prenait ces résultats dans leur ensemble, on pourrait générer l'hypothèse qui suit : Rad étant plus exprimée dans le RVOT avec un gradient transmural d'expression inverse de celui de Nav1.5, son effet sur le courant sodique serait plus prononcé dans cette zone. Cette diminution du courant sodique associée à une diminution du courant calcique provoquerait le ralentissement de la propagation électrique cardiaque dans cette région ce qui rejoindrait l'hypothèse selon laquelle le syndrome de Brugada est du à une perturbation de la dépolarisation dans le RVOT (Figure 4). De plus, étant donné la distribution transmurale de Rad et celle du canal, une hétérogénéité de la repolarisation peut être induite et valider l'hypothèse de la repolarisation proposée pour le syndrôme de Brugada (Antzelevitch. 2001 ; figure 5). Les troubles structuraux cellulaires et tissulaires aggraveraient le ralentissement de cette propagation à cause de la perte de connections, d'adhésions et de l'arrondissement cellulaire ce qui favoriserait le développement de la fibrose cardiaque, communément impliquée dans les troubles progressifs de la conduction et les phénomènes de réentrées électriques. Les troubles structuraux observés au niveau cellulaires au sein des cardiomyocytes dérivés d'iPSC portant de la variant Rad p.R211H vont en faveur de la troisième hypothèse proposée pour expliquer les troubles du rythmes observés dans le syndrôme de Brugada et vont favoriser l'apparition d'une hétérogénéité tissulaire au niveau du RVOT où Rad est très présent. Ces observations mènent à supposer qu'une association des trois hypothèses générées pour élucider le syndrôme serait envisagée pour interpréter et extrapoler nos résultats au phénotype des patients atteints (Figure 30).

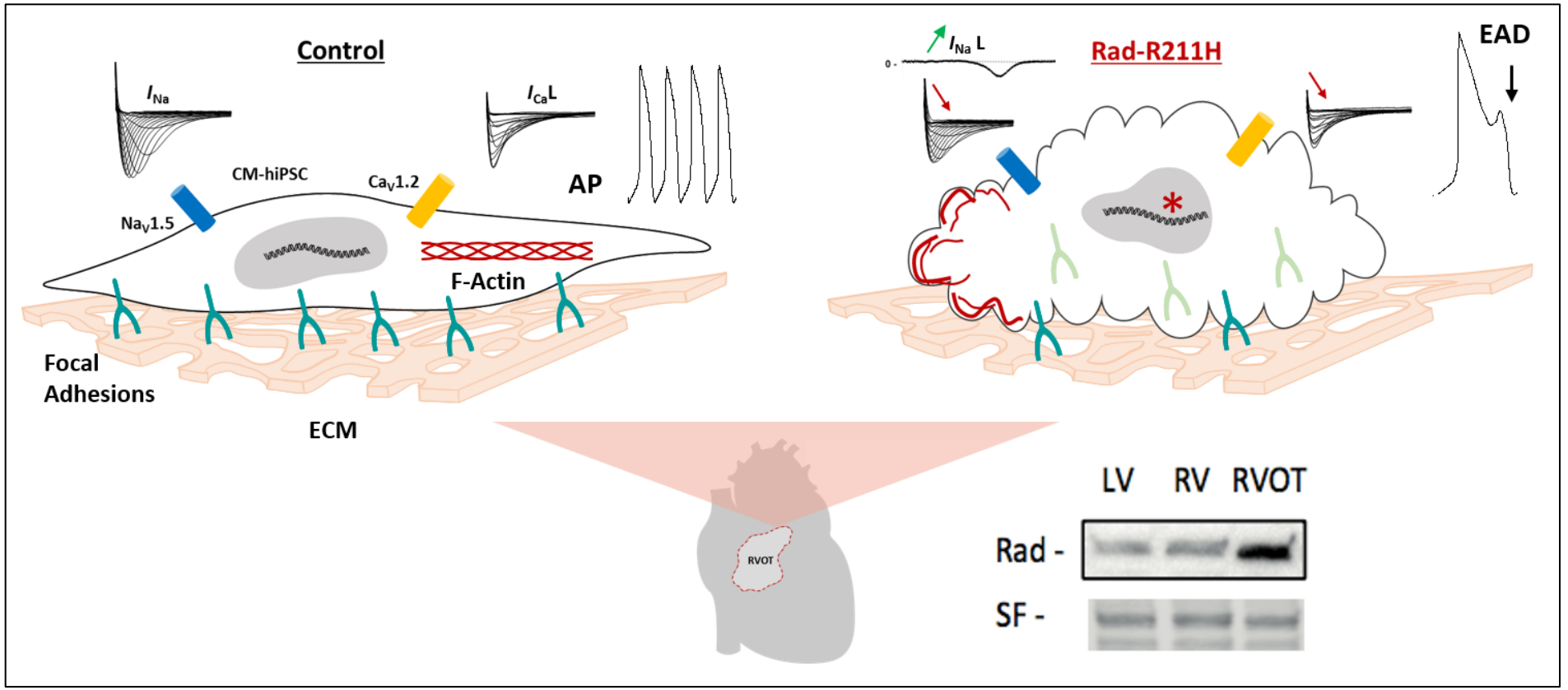


Figure 30 : schéma bilan de l'ensemble de la caractérisation électrique et structurale du phénotype induit par le variant Rad p.R211H

2. Perspectives :

Cette étude rassemble deux aspects de la physiologie cardiaque : la fonction électrique et la struture du cœur. Ces deux éléments sont, certes étroitement liés et très bien caractérisés séparément, mais la relation entre les deux reste peu connue. La caractérisation complète du phénotype induit par le variant Rad p.R211H a été l'occasion de traiter les subtilités de ces deux aspects à l'échelle cellulaire et de l'organe entier. Néanmoins, à chaque étape, les résultats obtenus soulevaient de nouvelles questions et orientaient le projet vers des directions différentes. Ceci s'explique par la complexité du phénotype du syndrome de Brugada, l'implication de la protéine Rad dans plusieurs voies de signalisations différentes et le choix des modèles d'étude. A ce stade, nous nous sommes contentés de décrire le phénotype induit par le variant p.R211H dans les trois modèles tout en étudiant les nouveaux aspects de la fonction de Rad dans les cardiomyocytes.

Sur le plan moléculaire :

L'étude de la voie de signalisation par laquelle Rad provoque la diminution du courant sodique reste inconnue et des études de biotinylation combinées à des co-immunoprécipitations entre Rad et les sous-unités α et β du canal sodique cardiaque sont nécessaires pour mettre en évidence une diminution de l'adressage de ce dernier à la membrane. Des expérimentations d'étude des compartiments intracellulaires plus poussées peuvent être envisagées en discriminant les protéines sequestrées dans le RS avec un traitement Endo H ou encore en étudiant l'activité du protéasome pour déterminer la stabilité de Nav1.5 en présence de Rad p.R211H.

D'autres parts, les mécanismes du phénotype structural observé sur les cellules doivent être identifiés. En particulier, il semble important de mettre en évidence une interaction potentielle de Rad avec ROCK, et l'impact de cette interaction sur son activité kinase dans un système d'expression hétérologue. Des formes de ROCK constitutivement inactives et actives sont disponibles et peuvent nous permettre de déterminer si Rad interagit avec le site catalytique de ROCK ou s'il le sequestre dans un compartiment subcellulaire éloigné de ses effecteurs.

La maturité des adhésions au sein des cardiomyocytes dérivés d'iPSC doit être évaluée par une quantification des formes phosphorylées de la Paxilline ou de la Vinculine ainsi que l'activité kinase de la FAK en présence et absence du variant Rad p.R211H mais aussi en présence de concentration différentes de calcium. De plus, il est important de déterminer l'impact de cette perte d'adhésion sur les propriétés migratoires des cellules. Des expérimentations de TimeLaps et des tests de migration cellulaire doivent êtres menées sur les cardiomyocytes contrôles et ceux qui expriment Rad p.R211H.

Par ailleurs, il serait intéréssant d'étudier la progression du remodelage du cytosquelette dans le temps au cours de la différenciation cardiaque. Des prises d'images ont été effectuées au stade IPS et aucune différence morphologique n'a été relevée entre les cellules contrôles et celles qui portent le variant. Il semblerait donc que le phénotype se déclare au cours de la différenciation cardiaque. Cette investigation est possible grace à la mise au point de sondes fluorescentes capables de marquer l'actine, les noyaux et la tubuline dans des cellules vivantes pendant 30 jours. Ceci permettrait de filmer les cardiomyocytes après le marquage et de voir la progression du remodelage du cytoquelette.

De manière intéressante, il semble que le variant Rad p.R211H provoque le même phénotype dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC que la surexpression de la forme sauvage de la protéine dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nées. Ceci laisserait supposer que la mutation aurait un effet 'gain de fonction' de la protéine native. Des expérimentations visant à mesurer l'activité GTPase intrinsèque de la protéine purifiée sauvage et mutée sont en cours, et les premiers résultats obtenus montrent une activité GTPase plus rapide de Rad p.R211H comparée à celle de Rad sauvage.

Sur le plan fonctionnel :

La production d'une lignée isogénique dans laquelle le variant aura été introduit par « génome editing » doit être envisagée pour renforcer la pertinence de la sélection du variant. L'effet d'inhibiteurs de la voie ROCK sur la densité des courants sodiques et calciques doit être testé dans des cardiomyocytes dérivés d'iPSC contrôles afin d'établir si la diminution observée passe par la perturbation du cytosquelette de ces cellules. Rad est connue comme étant un régulateur négatif de l'adressage des récepteurs GLUT4 à la membrane des fibres musculaires. Il serait intéressant d'étudier les conséquences métaboliques cardiaques qu'un gain de

fonction de Rad pourrait provoquer, surtout que le syndrome de Brugada a précédemment été lié au diabète de type 2.

Au cours de l'entretien des cardiomyocytes dérivés d'iPSC en culture, nous avons eu l'occasion de constater que les clones dérivés du patient atteint du syndrôme Brugada avaient tendance à faire de la différenciation spontannée en cellules neuronales. Au stade IPSC, il n'est pas anormal d'avoir de la différenciation spontannée modérée au cours de l'entretien des lignées. Les lignées contrôles présentaient aussi des colonies de cellules différenciées mais de tous types, alors que les lignées Brugada se différenciaient préférentiellement en neurones lorsqu'elles n'étaient pas engagées dans une différenciation cardiaque imposée. Cet élément nous a permi de faire le rapporchement avec les nombreux cas de syndrome de Brugada associés à des épisodes épiléptiques et le fait que les neurones présentent des homologies de fonction et de canaux, ce qui pourrait suggérer un lien entre les deux pathologies. Une étude des marqueurs de différentiation neuronaux au stade IPS et au stade de neurones différenciés pour les deux génotypes (Ctl et BrS) permettrait de vérifier cet hypothèse et détermminer de nouveaux marqueurs pour la pathologie.

Dans le modèle KI Rad R210H, les cœurs des souris âgées de 30 semaines seront digérés par perfusion d'enzyme et une étude des courants ioniques est programmée sur els cardiomyocytes isolés. Sur des souris du même âge, des potentiels d'action cardiaques seront enregistrés par une technique de microélectrode sur paroi ventriculaire entière, ce qui permettra de cibler le RVOT. Des points ECG et histologiques à l'âge de 45 semaines seront effectués sur ces souris pour établir si l'effet du variant est âge dépendant.

3. Conclusion :

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la caractérisation du phénotype fonctionnel d'un nouveau variant identifié au sein de notre laboratoire dans le cadre des investigations visant à mieux comprendre les mécanismes menant à l'apparition du syndrome de Brugada. La démarche scientifique adoptée a requis une approche électrophysiologique permettant de déterminer l'impact du variant identifié sur les propriétés électriques et sur l'organisation structurale à l'échelle cellulaire et de l'organe entier. Cette étude a permis de mettre en évidence le lien encore flou entre l'architecture cellulaire et la fonction électrique des cardiomyocytes et les conséquences engendrées sur l'un si l'autre est touché. De manière plus générale, cette étude est la première à montrer des troubles de l'ultrastructure des cardiomyocytes portants un variant provoquant le syndrome de Brugada, pathologie considérée à ce jour comme une cardiopathie purement rythmique. Le phénotype observé n'est pas surprenant étant donné l'implication de Rad dans des voies de signalisations apparentées à l'activité des protéines G monomériques dans l'intégrité du cytosquelette et son effet sur l'adressage des canaux a déjà été décrit dans le cadre du diabète de type 2 pour les récepteurs GLUT2 et plus récemment pour les canaux calciques de type L. Le variant R211H qui a potentiellement engendré un gain de fonction de la protéine a exacerbé ces deux fonctions qui, de manière intéressante, a engendré l'apparition du syndrome de Brugada, illustrant parfaitement la complexité de cette pathologie.

Références bibliographiques

Abbott GW. KCNE4 and KCNE5: K+ channel regulation and cardiac arrhythmogenesis. *Gene*. 2016;593(2):249-260. doi:10.1016/j.gene.2016.07.069.

Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;13(1):39-51.

Albert CM, Nam EG, Rimm EB, et al. Cardiac Sodium Channel Gene Variants and Sudden Cardiac Death in Women. *Circulation*. 2008;117(1):16-23. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.736330.

Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(6):517-527. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770069. Accessed August 17, 2017.

Antzelevitch C, Patocskai B. Brugada Syndrome: Clinical, Genetic, Molecular, Cellular, and Ionic Aspects. *Curr Probl Cardiol*. 2016;41(1):7-57. doi:10.1016/j.cpcardiol.2015.06.002.

Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, et al. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 2007;115(4):442-449.

Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, et al. Heterogeneity Within the Ventricular Wall. *Circ Res*. 1991;69(6):1427-1449.

Atarashi H. Characteristics of Patients With Right Block and ST-Segment Elevation Precordial Leads Bundle Branch in Right. 1993;9149:0-2.

Barajas-Martínez H, Hu D, Ferrer T, et al. Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in KCNJ8. *Hear Rhythm*. 2012;9(4):548-555.

Baroni D, Moran O. On the multiple roles of the voltage gated sodium channel Î²1 subunit in genetic diseases. *Front Pharmacol*. 2015;6:108.

Becker CM, Betz H, Schröder H. Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex. *Brain Res*. 1993;606(2):220-226.

Béguin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, et al. Nuclear Sequestration of β-Subunits by Rad and Rem is Controlled by 14-3-3 and Calmodulin and Reveals a Novel Mechanism for Ca2+ Channel Regulation. *J Mol Biol*. 2006;355(1):34-46. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.013.

Bellin M, Casini S, Davis RP, et al. Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome. *EMBO J*. 2013;32(1460-2075 (Electronic)):3161-3175. doi:10.1038/emboj.2013.240.

Bers DM, Shannon TR. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;58:59-66. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.002.

Besson P, Driffort V, Bon É, Gradek F, Chevalier S, Roger S. How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2015;1848(10):2493-2501.

Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, et al. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet*. 2013;45(9):1044-1049.

Bilan PJ, Moyers JS, Kahn CR. The ras-related protein rad associates with the cytoskeleton in a non-lipid-dependent manner. *Exp Cell Res*. 1998;242(2):391-400.

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 2000;348 Pt 2:241-255.

Boczek NJ, Ye D, Johnson EK, et al. Characterization of SEMA3A-encoded semaphorin as a naturally occurring Kv4.3 protein inhibitor and its contribution to Brugada syndrome. *Circ Res*. 2014;115(4):460-469.

Boukens BJ, Sylva M, de Gier-de Vries C, et al. Reduced Sodium Channel Function Unmasks Residual Embryonic Slow Conduction in the Adult Right Ventricular Outflow Tract. *Circ Res*. 2013;113(2):137-141.

Boukens BJ, Walton R, Meijborg VM, Coronel R. Transmural electrophysiological heterogeneity, the T-wave and ventricular arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol*. 2016;122(3):202-214. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.009.

Boukens BJ, Coronel R, Christoffels VM. Embryonic development of the right ventricular outflow tract and arrhythmias. *Hear Rhythm*. 2016;13(2):616-622.

Boukens BJD, Christoffels VM, Coronel R, Moorman AFM. Developmental Basis for Electrophysiological Heterogeneity in the Ventricular and Outflow Tract Myocardium As a Substrate for Life-Threatening Ventricular Arrhythmias. *Circ Res*. 2008;104(1).

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991;349(6305):117-127.

Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, Brugada P E. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation*. 2000;101(5):510-515.

Brugada P, Brugada J. 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):1391-1396.

Buraei Z, Yang J. Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels by RGK Proteins. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;8(2):180-187.

Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855-860.

Butters CA, Willadsen KA, Tobacman LS. Cooperative interactions between adjacent troponin-tropomyosin complexes may be transmitted through the actin filament. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15565-15570.

Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003;5(6):877-889.

Cai C-L, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*. 2008;454(July):104-108. doi:10.1038/nature06969.

Campiglio M, Flucher BE. The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol*. 2015;230(9):2019-2031.

Case LB, Waterman CM. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):955-963.

Castelletti S, Vischer AS, Syrris P, et al. Desmoplakin missense and non-missense mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Genotype-phenotype correlation. *Int J Cardiol*. May 2017.

Chang DD, Colecraft HM. Rad and Rem are non-canonical G-proteins with respect to the regulatory role of guanine nucleotide binding in Ca(V)1.2 channel regulation. *J Physiol*. 2015;593(23):5075-5090.

Chang L, Zhang J, Tseng YH, et al. Rad GTPase deficiency leads to cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2007;116(25):2976-2983.

Chari S, Mao S. Timeline: iPSCs—The First Decade. *Cell Stem Cell*. 2016;18(2):294.

Cheng J, Kyle JW, Lang D, et al. An East Asian Common Variant Vinculin P.Asp841His Was Associated With Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome in the Chinese Han Population. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(4):e005330.

Cheng J, Kyle JW, Wiedmeyer B, Lang D, Vaidyanathan R, Makielski JC. Vinculin variant M94I identified in sudden unexplained nocturnal death syndrome decreases cardiac sodium current. *Sci Rep*. 2017;7(September 2016):42953.

Chen-Izu Y, Shaw RM, Pitt GS, et al. Na^+ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol*. 2015;593(6):1347-1360.

Chevray PM, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(13):5789-5793.

Chiang M-Y, Lin Y-Z, Chang S-J, Shyu W-C, Lu H-E, Chen S-Y. Direct Reprogramming of Human Suspension Cells into Mesodermal Cell Lineages via Combined Magnetic Targeting and Photothermal Stimulation by Magnetic Graphene Oxide Complexes. *Small*. June 2017:1700703.

Chioni A-M, Brackenbury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MBA. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na+ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(5):1216-1227. doi:10.1016/j.biocel.2008.11.001.

Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AFM. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res*. 2010;106(2):240-254.

Cohen L, Mohr R, Chen YY, et al. Transcriptional activation of a ras-like gene (kir) by oncogenic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12448-12452.

Coonar a S, Protonotarios N, Tsatsopoulou a, et al. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation*. 1998;97(20):2049-2058.

Correll RN, Pang C, Finlin BS, Dailey AM, Satin J, Andres DA. Plasma Membrane Targeting Is Essential for Rem-mediated Ca $^{2+}$ Channel Inhibition. *J Biol Chem*. 2007;282(39):28431-28440.

Correll RN, Pang C, Niedowicz DM, Finlin BS, Andres DA. The RGK family of GTP-binding proteins: Regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling. *Cell Signal*. 2008;20(2):292-300.

David L, Hirsch CL. How Tets and Cytoskeleton Dynamics MET in Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2014;14(4):417-418.

David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res*. 2014;12(3):754-761.

Davis RP, Casini S, van den Berg CW, et al. Cardiomyocytes Derived From Pluripotent Stem Cells Recapitulate Electrophysiological Characteristics of an Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease. *Circulation*. 2012;125(25):3079-3091.

Del Villar K, Dorin D, Sattler I, et al. C-terminal motifs found in Ras-superfamily G-proteins: CAAX and C-seven motifs. *Biochem Soc Trans*. 1996;24(3):709-713.

Dell'Era P, Benzoni P, Crescini E, et al. Cardiac disease modeling using induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):329-342.

Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*. 2012;125(4):620-637.

Easley CA, Brown CM, Horwitz AF, Tombes RM. CaMK-II promotes focal adhesion turnover and cell motility by inducing tyrosine dephosphorylation of FAK and paxillin. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008;65(8):662-674.

Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, et al. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 2012;95(4):419-429.

Elizari MV, Levi R, Acunzo RS, et al. Abnormal expression of cardiac neural crest cells in heart development: A different hypothesis for the etiopathogenesis of Brugada syndrome. *Hear Rhythm*. 2007;4(3):359-365.

Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet*. 2010;42(3):240-244.

Epstein JA. Cardiac Development and Implications for Heart Disease. 2010.

Epstein JA, Aghajanian H, Singh MK. Semaphorin signaling in cardiovascular development. *Cell Metab*. 2015;21(2):163-173.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.

Fatima A, Xu G, Shao K, et al. <i>In vitro</i> Modeling of Ryanodine Receptor 2 Dysfunction Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(4):579-592.

Feaster TK, Cadar AG, Wang L, et al. Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2015;117(12):CIRCRESAHA.115.307580.

Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):7.

Finlin BS, Andres DA. Rem is a new member of the Rad- and Gem/Kir Ras-related GTP-binding protein family repressed by lipopolysaccharide stimulation. *J Biol Chem*. 1997;272(35):21982-21988.

Finlin BS, Shao H, Kadono-Okuda K, Guo N, Andres DA. Rem2, a new member of the Rem/Rad/Gem/Kir family of Ras-related GTPases. *Biochem J*. 2000;347 Pt 1:223-231.

Finlin BS, Crump SM, Satin J, Andres D a. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14469-14474.

Fischer R, Wei Y, Anagli J, Berchtold MW. Calmodulin binds to and inhibits GTP binding of the ras-like GTPase Kir/Gem. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25067-25070.

Flynn R, Chen L, Hameed S, Spafford JD, Zamponi GW. Molecular determinants of Rem2 regulation of N-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368(3):827-831.

Fu M, Zhang J, Tseng Y-H, et al. Rad GTPase attenuates vascular lesion formation by inhibition of vascular smooth muscle cell migration. *Circulation*. 2005;111(8):1071-1077.

Fukuyama M, Ohno S, Wang Q, et al. L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circ J*. 2013;77(7):1799-1806.

Gabellini N. Transcriptional Regulation by cAMP and Ca²⁺ Links the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger 3 to Memory and Sensory Pathways. *Mol Neurobiol*. 2004;30(1):091-116.

Gavillet B, Rougier J-S, Domenighetti AA, et al. Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin. *Circ Res*. 2006;99(4):407-414.

Giudicessi JR & Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias—diagnosis and therapy. *Nature Review Cardiology*. 2012; (9) 319-332

Goedel A, My I, Sinnecker D, Moretti A. Perspectives and Challenges of Pluripotent Stem Cells in Cardiac Arrhythmia Research. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(3):23.

Gourraud J-B, Barc J, Thollet A, et al. The Brugada Syndrome: A Rare Arrhythmia Disorder with Complex Inheritance. *Front Cardiovasc Med*. 2016;3(April):1-11.

Gunton JE, Sisavanh M, Stokes RA, et al. Mice deficient in GEM GTPase show abnormal glucose homeostasis due to defects in beta-cell calcium handling. Planas J V., ed. *PLoS One*. 2012;7(6):e39462.

Hamazaki T, El Rouby N, Fredette NC, Santostefano KE, Terada N. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell Research in the Era of Precision Medicine. TL - 35. *Stem Cells*. 2017;35 VN-r(3):545-550.

Hanlon MRH, Wallace BA. Structure and Function of Voltage-Dependent Ion Channel Regulatory β Subunits†. 2002.

Hawke TJ, Kanatous SB, Martin CM, Goetsch SC, Garry DJ. Rad is temporally regulated within myogenic progenitor cells during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(2):C379-C387.

He J-Q, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human Embryonic Stem Cells Develop Into Multiple Types of Cardiac Myocytes: Action Potential Characterization. *Circ Res*. 2003;93(1):32-39..

Hendriks WT, Warren CR, Cowan CA. Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell*. 2016;18(1):53-65.

Heo WD, Inoue T, Park WS, et al. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 Lipids Target Proteins with Polybasic Clusters to the Plasma Membrane. *Science (80-)*. 2006;314(5804):1458-1461.

Hsiao BY, Chen CC, Hsieh PC, et al. Rad is a p53 direct transcriptional target that inhibits cell migration and is frequently silenced in lung carcinoma cells. *J Mol Med*. 2011;89(5):481-492. doi:10.1007/s00109-010-0717-z.

Hsiao B-Y, Chang T-K, Wu I-T, Chen M-Y. Rad GTPase inhibits the NFκB pathway through interacting with RelA/p65 to impede its DNA binding and target gene transactivation. *Cell Signal*. 2014;26(7):1437-1444.

Huang X, Cong X, Yang D, et al. Identification of Gem as a new candidate prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Pathol - Res Pract*. 2014;210(11):719-725.

Humeau J, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium*. July 2017.

Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells???What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells*. 2017;35(1):17-25.

Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J*. 1996;15(8):1885-1893.

Itzen A, Goody RS. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(1):48-56.

Jabbari J, Olesen MS, Yuan L, et al. Common and rare variants in SCN10A modulate the risk of atrial fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(1):64-73.

James A. Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor SSS, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel VSM, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-)*. 1998;282(5391):1145-1147.

Juang JMJ, Horie M. Genetics of Brugada syndrome. *J Arrhythmia*. 2016;32(5):418-425.

Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):180-191.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001;108(3):407-414.

Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm. *Dev Cell*. 2001;1(3):435-440.

Khan IA, Nair CK. Brugada and Long QT-3 Syndromes: Two Phenotypes of the Sodium Channel Disease. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2004;9(3):280-289.

Kim C, Wong J, Wen J, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494(7435):105-110.

Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med*. 2017;49(4):e322.

Knollmann BC. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Boutique Science or Valuable Arrhythmia Model? *Circ Res*. 2013;112(6):969-976.

Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, et al. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci*. 2013;16(2):201-209.

Kruger RP, Aurandt J, Guan K-L. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(10):789-800.

Kumar M, Govindan S, Zhang M, et al. Cardiac Myosin-binding Protein C and Troponin-I Phosphorylation Independently Modulate Myofilament Length-dependent Activation. *J Biol Chem*. 2015;290(49):29241-29249.

Kuppusamy KT, Jones DC, Sperber H, et al. Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(21):E2785-94.

Lahti AL, Kujala VJ, Chapman H, et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech*. 2012;5(2):220-230.

Langbeheim H, Shih TY, Scolnick EM. Identification of a normal vertebrate cell protein related to the p21 src of Harvey murine sarcoma virus. *Virology*. 1980;106(2):292-300.

Lee Y-K, Ng K-M, Lai W-H, et al. Calcium Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(4):976-986.

Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Delmar M. The cardiac connexome: Non-canonical functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;50:13-21.

Leone a, Mitsiades N, Ward Y, et al. The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma. *Oncogene*. 2001;20(25):3217-3225.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5313-5327.

Liang P, Sallam K, Wu H, et al. Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(19):2086-2096.

Ligeti E, Welti S, Scheffzek K. Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev*. 2012;92(1):237-272.

Limpitikul WB, Dick IE, Tester DJ, et al. A Precision Medicine Approach to the Rescue of Function on Malignant Calmodulinopathic Long-QT SyndromeNovelty and Significance. *Circ Res*. 2017;120(1):39-48.

Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1659-1720.

Loirand G, Scalbert E, Bril A, Pacaud P. Rho exchange factors in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(2):174-180.

Lombardi R, Dong J, Rodriguez G, et al. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res*. 2009;104(9):1076-1084.

Ma D, Wei H, Lu J, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2013;34(15):1122-1133.

Mahalakshmi RN, Ng MY, Guo K, Qi Z, Hunziker W, Béguin P. Nuclear Localization of Endogenous RGK Proteins and Modulation of Cell Shape Remodeling by Regulated Nuclear Transport. *Traffic*. 2007;8(9):1164-1178.

Malan D, Friedrichs S, Fleischmann BK, Sasse P. Cardiomyocytes Obtained From Induced Pluripotent Stem Cells With Long-QT Syndrome 3 Recapitulate Typical Disease-Specific Features In Vitro. *Circ Res*. 2011;109(8):841-847.

Mall M, Wernig M. The novel tool of cell reprogramming for applications in molecular medicine. *J Mol Med*. 2017;95(7):695-703.

Manning JR, Withers CN, Levitan B, Smith JD, Andres DA, Satin J. Loss of Rad-GTPase produces a novel adaptive cardiac phenotype resistant to systolic decline with aging. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2015;309(8):H1336-H1345.

Manning JR, Yin G, Kaminski CN, et al. Rad GTPase deletion increases L-type calcium channel current leading to increased cardiac contraction. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(6):e000459.

Marban E. Cardiac channelopathies. *Nature Reviews.* 2002; vol 415.

Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, et al. Right ventricular dysplasia: A report of 24 adult cases. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 1999;4(1):97-111.

Margolis G, Khoury S, Ben-Shoshan J, et al. Prognostic Implications of Mid-Range Left Ventricular Ejection Fraction on Patients Presenting With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2017;120(2).

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(12):7634-7638.

Matsa E, Rajamohan D, Dick E, et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J*. 2011;32(8):952-962.

McFadden DG, Barbosa AC, Richardson J a, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development*. 2005;132(1):189-201.

Meregalli PG, Wilde AAM, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 2005;67(3):367-378.

Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res*. 1998;39(2):280-300.

Miyazaki T, Mitamura H, Miyoshi S, Soejima K, Aizawa Y, Ogawa S. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1061-1070.

Molina-Navarro MM, Roselló-Lletí E, Ortega A, et al. Differential gene expression of cardiac ion channels in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(12):1-10.

Moreau A, Mercier A, Thériault O, et al. Biophysical, Molecular, and Pharmacological Characterization of Voltage-Dependent Sodium Channels From Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Can J Cardiol*. 2017;33(2):269-278.

Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1397-1409.

Moyers JS, Bilan PJ, Zhu J, Kahn CR. Rad and Rad-related GTPases interact with calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 1997;272(18):11832-11839.

Moyers JS, Zhu J, Kahn CR. Effects of phosphorylation on function of the Rad GTPase. *Biochem J*. 1998;333 Pt 3:609-614.

Moyers JS, Bilan PJ, Reynet C, Kahn CR. Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23111-23116.

Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells. *Circulation*. 2003;107(>21):2733-2740.

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*. 1996;93(1):168-177.

Nademanee K, Veerakul G, Chandanamattha P, et al. Prevention of Ventricular Fibrillation Episodes in Brugada Syndrome by Catheter Ablation Over the Anterior Right Ventricular Outflow Tract EpicardiumClinical Perspective. *Circulation*. 2011;123(12):1270-1279.

Napolitano C, Antzelevitch C. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res*. 2011;108(5):607-618.

Novak A, Barad L, Lorber A, et al. Functional abnormalities in iPSC-derived cardiomyocytes generated from CPVT1 and CPVT2 patients carrying ryanodine or calsequestrin mutations. *J Cell Mol Med*. 2015;19(8):2006-2018.

Novak A, Barad L, Zeevi-Levin N, et al. Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β-adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med*. 2012;16(3):468-482.

Nunes SS, Miklas JW, Liu J, et al. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2013;10(8):781-787.

O'Malley HA, Isom LL. Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:481-504.

Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*. 1989;341(6239):209-214.

Pan JY, Fieles WE, White AM, Egerton MM, Silberstein DS. Ges, A human GTPase of the Rad/Gem/Kir family, promotes endothelial cell sprouting and cytoskeleton reorganization. *J Cell Biol*. 2000;149(5):1107-1116.

Patel F, Brackenbury WJ. Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer. *Int J Dev Biol*. 2015;59(7-8-9):357-366.

Pitt GS, Lee S-Y. Current view on regulation of voltage-gated sodium channels by calcium and auxiliary proteins. *Protein Sci*. 2016;25(9):1573-1584.

Pucéat M. Les cellules souches embryonnaires : Du développement myocardique à la médecine régénératrice. *médecine/sciences*. 2005;21(12):1076-1082.

Puhl HL, Lu VB, Won Y-J, et al. Ancient origins of RGK protein function: modulation of voltage-gated calcium channels preceded the protostome and deuterostome split. *PLoS One*. 2014;9(7):e100694.

Racca AW, Klaiman JM, Pioner JM, et al. Contractile properties of developing human fetal cardiac muscle. *J Physiol*. 2016;594(2):437-452.

Rattanawong P, Vutthikraivit W, Charoensri A, et al. Fever-Induced Brugada Syndrome Is More Common Than Previously Suspected: A Cross-Sectional Study from an Endemic Area. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2016;21(2):136-141.

Refsgaard L, Olesen MS, Møller DV, et al. Mutation analysis of the candidate genes SCN1B-4B, FHL1, and LMNA in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Atg*. 2012;1(C):44-46.

Reinhard J, Scheel AA, Diekmann D, Hall A, Ruppert C, Bähler M. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J*. 1995;14(4):697-704.

Remme CA, Verkerk AO, Hoogaars WMH, et al. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(5):511-522.

Rima M, Daghsni M, Fajloun Z, et al. Protein partners of the calcium channel subunit highlight new cellular functions. *Biochem J*. 2016;473(13):1831-1844.

Roberts R, Brugada R. Genetics and Arrhythmias. *Annu Rev Med*. 2003;54(1):257-267.

Rocchetti M, Sala L, Dreizehnter L, et al. Elucidating arrhythmogenic mechanisms of long-QT syndrome CALM1-F142L mutation in patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2017;113(5):531-541.

Roger S, Gillet L, Le Guennec J-Y, Besson P. Voltage-gated sodium channels and cancer: is

Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol*. 2012;196(2):189-201.

Rubart M, Zipes DP. Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2305-2315.

Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells*. 2007;25(5):1136-1144.

Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(11):5192-5196.

Scolnick EM, Papageorge AG, Shih TY. Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(10):5355-5359.

Scolnick EM, Shih TY, Maryak J, Ellis R, Chang E, Lowy D. Guanine nucleotide binding activity of the src gene product of rat-derived murine sarcoma viruses. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;354:398-409.

Shang R, Wang J, Sun W, et al. RRAD inhibits aerobic glycolysis, invasion, and migration and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol*. 2016;37(4):5097-5105.

Sieira J, Dendramis G, Brugada P. Pathogenesis and management of Brugada syndrome. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(12):744-756.

Soltysinska E, Olesen SP, Christ T, et al. Transmural expression of ion channels and transporters in human nondiseased and end-stage failing hearts. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2009;459(1):11-23.

Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The Number of Activating KIR Genes Inversely Correlates with the Rate of CMV Infection/Reactivation in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2008;8(6):1312-1317.

Stillitano F, Hansen J, Kong C-W, et al. Modeling susceptibility to drug-induced long QT with a panel of subject-specific induced pluripotent stem cells. *Elife*. 2017;6.

SUBRAMANIAN M, PRABHU MA, HARIKRISHNAN M, SHEKHAR SS, PAI PG, NATARAJAN K. The Utility of Exercise Testing in Risk Stratification of Asymptomatic Patients with type 1 Brugada Pattern. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2017.

Sun Z, Zhang J, Zhang J, et al. Rad GTPase induces cardiomyocyte apoptosis through the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(1):52-57.

Suzuki M, Shigematsu H, Shames DS, et al. Methylation and gene silencing of the Ras-related GTPase gene in lung and breast cancers. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(4):1397-1404.

Szél T, Antzelevitch C. Abnormal Repolarization as the Basis for Late Potentials and Fractionated Electrograms Recorded From Epicardium in Experimental Models of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(19):2037-2045.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.

Talib AK, Sato N, Myojo T, et al. Insight into specific pro-arrhythmic triggers in Brugada and early repolarization syndromes: results of long-term follow-up. *Heart Vessels*. 2016;31(12):2035-2044.

Tamargo J, Caballero R, Núñez L, Gómez R, Vaquero M, Delpón E. Genetically engineered mice as a model for studying cardiac arrhythmias. *Front Biosci*. 2007;12:22-38.

Ten Sande JN, Coronel R, Conrath CE, et al. ST-Segment Elevation and Fractionated Electrograms in Brugada Syndrome Patients Arise from the Same Structurally Abnormal Subepicardial RVOT Area but Have a Different Mechanism. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2015;8(6):1382-1392.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.

Tohyama S, Fukuda K. Safe and Effective Cardiac Regenerative Therapy With Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res*. 2017;120(10):1558-1560.

Tohyama S, Tanosaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Clinical Application. *Curr Stem Cell Reports*. 2017;3(1):28-34.

Tohyama S, Tanosaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Clinical Application. *Curr Stem Cell Reports*. 2017;3(1):28-34.

Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor , Plexin-A1 , with off-tack and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev*. 2004:1-13.

Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, et al. Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. *Nat Cell Biol*. 2004;6(12):1204-1211.

Tseng Y, Vicent D, Zhu J, Niu Y. Regulation of growth and tumorigenicity of breast cancer cells by the low molecular weight GTPase Rad and nm23. *Cancer Res*. 2001;(25):2071-2079.

van der Sluijs P, Hull M, Huber LA, Mâle P, Goud B, Mellman I. Reversible phosphorylation--dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J*. 1992;11(12):4379-4389.

Vermij SH, Abriel H, van Veen TAB. Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res*. 2017;113(3):259-275.

Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of Sodium and Calcium Dysregulation in Tachyarrhythmias in Sudden Cardiac Death. *Circ Res*. 2015;116(12):1956-1970.

Waldo KL, Lo CW, Kirby ML. Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev Biol*. 1999;208(2):307-323.

Wang G, Zhu X, Xie W, et al. Rad as a novel regulator of excitation-contraction coupling and β-adrenergic signaling in heart. *Circ Res*. 2010;106(2):317-327.

Wang Q, Chen Q, Kirsch GE, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998;392(6673):293-296.

Wang YY, Mesirca P, Marqués-Sulé E, et al. RyR2R420Q catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation induces bradycardia by disturbing the coupled clock pacemaker mechanism. *JCI insight*. 2017;2(8).

Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, et al. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol*. 2002;157(2):291-302.

Watanabe H, Minamino T. Genetics of Brugada syndrome. *J Hum Genet*. 2016;61(1):57-60.

Whitaker AM, Farooq MA, Edwards S, Gilpin NW. HHS Public Access. 2016;19(1):69-77.

Wilde AAM, Brugada R. Phenotypical Manifestations of Mutations in the Genes Encoding Subunits of the Cardiac Sodium Channel. *Circ Res*. 2011;108(7):884-897.

Winslow RL, Walker MA, Greenstein JL. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(1):37-67.

Yada H, Murata M, Shimoda K, et al. Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type Ca2+ channels in the heart. *Circ Res*. 2007;101(1):69-77.

Yamakawa H, Murata M, Suzuki T, et al. Suppression of Rad leads to arrhythmogenesis via PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor activity in the heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):701-707.

Yan J-J, Xie B, Zhang L, et al. Small GTPases and Stress Responses of vvran1 in the Straw Mushroom Volvariella volvacea. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1527.

Yang T, Xu X, Kernan T, Wu V, Colecraft HM. Rem, a member of the RGK GTPases, inhibits recombinant CaV1.2 channels using multiple mechanisms that require distinct conformations of the GTPase. *J Physiol*. 2010;588(Pt 10):1665-1681.

Yang W, Zheng H, Wang Y, Lian F, Hu Z, Xue S. Nesprin-1 has key roles in the process of mesenchymal stem cell differentiation into cardiomyocyte-like cells inï¿½vivo and inï¿½vitro. *Mol Med Rep*. 2014;11(1):133-142.

Yanuar A, Sakurai S, Kitano K, Hakoshima T. Crystal structure of human Rad GTPase of the RGK-family. *Genes to Cells*. 2006;11(8):961-968.

Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011;471(7337):230-234.

Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. *Circ Res*. 2017;120(12):1958-1968.

Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. *Circ Res*. 2017;120(12):1958-1968.

Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. *Circ Res*. 2017;120(12).

Yu B, He Z-Y, You P, et al. Reprogramming Fibroblasts into Bipotential Hepatic Stem Cells by Defined Factors. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):328-340.

Yu, Vodyanik, Smuga-Otto, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Sci (New York, NY)*. 2007;318(5858):1917-1920.

Zhang J, Chang L, Chen C, et al. Rad GTPase inhibits cardiac fibrosis through connective tissue growth factor. *Cardiovasc Res*. 2011;91(1):90-98.

Zhu J, Bilan PJ, Moyers JS, Antonetti DA, Kahn CR. Rad, a novel Ras-related GTPase, interacts with skeletal muscle beta-tropomyosin. *J Biol Chem*. 1996;271(2):768-773.

Zhu J, Reynet C, Caldwell JS, Kahn CR. Characterization of Rad, a new member of Ras/GTPase superfamily, and its regulation by a unique GTPase-activating protein (GAP)-like activity. *J Biol Chem*. 1995;270(9):4805-4812.

Zhu J, Bilan PJ, Moyers JS, Antonetti D a., Kahn CR. Rad, a novel Ras-related GTPase, interacts with skeletal muscle β-tropomyosin. *J Biol Chem*. 1996;271(2):768-773.

Zima A V., Copello JA, Blatter LA. Effects of cytosolic NADH/NAD $^{+}$ levels on sarcoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ release in permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2004;555(3):727-741.

Annexes

Arrhythmias induce cardiomyopathy and remodeling of Ca^{2+} handling proteins in a novel model of long QT syndrome

Jérôme Montnach,[1*#] Franck F. Chizelle,[1#] Nadjet Belbachir,[1] Linwei Li,[3] Gildas Loussouarn,[1] Gilles Toumaniantz,[1] Agnès Carcouet,[1] Anne Julia Meinzinger,[4] Doron Shmerling,[4] Jean-Pierre Benitah,[3] Ana Maria Gómez,[3] Flavien Charpentier[1,2§], Isabelle Baró[1§]

[1] l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

[2] l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France

[3]INSERM, UMR S1180, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

[4]PolyGene AG, Rümlang, Switzerland

* present address: Leon H Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine (NYU-SoM), 522 First Avenue, Smilow 805, New York, NY 10016, USA.

Short title: Type 3 long QT syndrome and Ca^{2+} remodeling

Word Count: 8021

# Equal contribution

§ Co-corresponding authors, jointly directed this work
Isabelle BARÓ
l'institut du thorax
Inserm UMR S1087, CNRS UMR C6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
isabelle.baro@inserm.fr
Tel. +33 228 08 01 50; Fax. +33 228 08 01 30
or Flavien CHARPENTIER
same address
E-mail: flavien.charpentier@inserm.fr
Tel. +33 228 08 01 10 64; Fax. +33 228 08 01 30

Abstract

Aim. Deletion of QKP1507-1509 amino-acids in *SCN5A* gene product, the voltage-gated Na^+ channel Nav1.5, has been associated with a large phenotypic spectrum of type 3 long QT syndrome, conduction disorder, dilated cardiomyopathy and high incidence of sudden death. The aim of this study was to identify the pathophysiological mechanism of dilated cardiomyopathy and consequences of the QKP1507-1509 deletion. **Methods and results.** We generated a knock-in mouse presenting the delQKP1510-1512 mutation (*Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$) equivalent to human deletion. As observed in patients, *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice showed prolonged QT interval, conduction defects, ventricular arrhythmias, premature mortality and signs of heart failure. Ventricular action potentials from *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice were prolonged. The mutation increased Na^+ window current and generated a late Na^+ current. As a consequence, we show that *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibited a remodeling leading to $[Ca^{2+}]_i$ transients with higher amplitude and slower kinetics, combined with enhanced SR Ca^{2+} load at slow rates. SERCA2 expression was not altered. However, total phospholamban expression was increased whereas the amount of Ca^{2+}-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)-dependent T17-phosphorylated form was decreased. This was associated with a lower activity of CaMKII and decreased expression of calmodulin. In addition, *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes showed increased Ca^{2+} waves, correlated with the presence of afterdepolarizations during action potential recording. Ranolazine partially prevented action potential and QT interval prolongation in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice and suppressed arrhythmias. **Conclusion.** The *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse model recapitulates the clinical phenotype of mutation carriers and provides new and unexpected insights into the pathology of the patients carrying the QKP1507-1509 deletion.

Key words: *Scn5a*, long QT syndrome, dilated cardiomyopathy, arrhythmias, intracellular Ca^{2+} homeostasis

1. Introduction

Long QT syndrome (LQTS) is a severe disorder of cardiac electrical activity. It is caused by delayed repolarization in ventricular cardiomyocytes, which results in a prolonged QT interval on the ECG and an increased susceptibility to polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. Mutations in genes encoding ion channels or their accessory subunits are linked to different types of LQTS.[1] Approximately 90% of LQTS mutations are in *KCNQ1* (LQTS1), *KCNH2* (LQTS2) and *SCN5A* (LQTS3) genes. Specifically, mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac Na^+ channel Nav1.5 commonly alter the fast inactivation process of the channel. Physiologically, Nav1.5 channels activate rapidly to generate a large transient inward Na^+ current ($I_{Na,T}$) and inactivate within a few milliseconds. This current initiates the action potential of highly polarized cardiomyocytes. Nevertheless, the Na^+ current also includes a much smaller sustained component, called late Na^+ current ($I_{Na,L}$), which remains activated during repolarization. LQT3 mutations result in a marked slowing of Nav1.5 inactivation and increase of $I_{Na,L}$ that prolong the action potential.[2,3]

Deletion of amino acid residues 1507–1509 QKP, close to the "historical" KPQ1505-1507 deletion,[4] has been identified in two families.[5,6] This mutation is associated not only with LQTS3 but also with a broader phenotypic spectrum including conduction disorder, dilated cardiomyopathy (DCM) and a high incidence of sudden death.[6] *In vitro* experiments in an heterologous expression system revealed that QKP1507-1509 deletion induced a $I_{Na,L}$.[5] To characterize the effects of this deletion in a physiological environment, we generated a knock-in mouse model carrying the mouse equivalent (delQKP1510-1512; $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mouse) to the human QKP1507-1509 deletion. Heterozygous $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mice share common features with patients, including long QT interval, ventricular arrhythmias, heart failure and increased risk of sudden death at a young age. We found that the deletion secondarily decreased Ca^{2+}-calmodulin dependent kinase II (CaMKII) activation, leading to altered expression and phosphorylation of key Ca^{2+} handling proteins and abnormal Ca^{2+} cycling, which may participate in the observed phenotype. Acute treatment with the $I_{Na,L}$ inhibitor ranolazine partially prevented QT interval prolongation and suppressed arrhythmias with no effects on conduction, suggesting that it could be appropriate to be used in patients with the QKP1507-1509 deletion.

2. Methods

A full description of the methods is available in the supplementary material online.

The *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse model was generated in PolyGene AG facilities, according to the Swiss Federal Animal Protection Law. The experimental procedures were approved by the Cantonal Veterinary Administration, Bern, Switzerland. We used Flp/FRT-mediated targeting to delete residues 1510–1512 (QKP) in the *Scn5a* gene (see supplementary material online, methods and Figure S1). Subsequent animal experiments were performed in the animal facility of Nantes University Health Research Institute (*UTE – IRS-UN*) which has been accredited by the French Ministry of Agriculture. The experimental procedures were approved by the regional ethic committee (CEEA – Pays de la Loire, France) according to the Directive 2010/63/EU of the European Union.

Western blot analysis.

Protein samples were prepared from left ventricular free walls. Forty micrograms of proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with primary antibodies targeted against Nav1.5 (ASC-005, Alomone Labs; 1:500), SERCA2 (PA5-29380 Thermo Scientific; 1:2000), Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX1 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), CaMKII (PA5-22168 Thermo Scientific; 1:1000), p-CaMKII (MA1-047 Thermo Scientific; 1:2000), ox-CaMKII (GTX36254 GeneTex; 1:1000), phospholamban (PLB; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), pPLB-T17 (Santa Cruz Biotechnology; 1:5000), type 2 ryanodine receptor (RyR2; MA3-925 Thermo Scientific; 1:2000), pRyR2-S2808 (A010-30 Badrilla; 1:4000) and pRyR2-S2814 (A010-31 Badrilla; 1:4000). In addition, an anti-GAPDH antibody (Santa-Cruz Biotechnologies; 1:10000 dilution) was used as an external/internal control. Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (Santa Cruz; 1:10000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence. Western-blot quantification was performed with Image J 1.45b software (NIH Software).

Electrocardiography.

Six-lead ECGs were recorded on mice anesthetized with isoflurane with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and off-line analysis (ECG Auto v3.2.0.2, EMKA Technologies). ECGs were analyzed as previously described.[7]

Morphological and histological analysis.

Mouse heart, lungs and liver were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with haematoxylin/eosin and examined with a classic light microscope.

Immunohistochemistry.

Heart cryosections and isolated cardiomyocytes were immunostained for α-actinin 2. The samples were blocked and permeabilized before incubation with primary and secondary antibodies. Sections were mounted using ProLong Gold Antifade mountant with DAPI (Thermo Fischer Scientific) to counter-stain nuclei.

To visualize t-tubule network, freshly isolated cardiomyocytes were stained with Di-8 ANEPPS (Invitrogen). The samples were imaged with a Nikon A1 confocal microscope (objective o.i. 60x, N.A. 1.4, Nikon) and captured with NIS-Elements software. Directional analysis of α-actinin 2 and t-tubule staining were performed with ImageJ, as described by Wagner *et al*.[8]

Echocardiography

Two-dimensional echocardiography was performed on mice anaesthetized with isoflurane using a Vivid 7 Dimension ultrasonography (GE Healthcare) with a 14-MHz transducer. Left ventricular diameter and free wall thickness, as well as septal thickness, were measured from long-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic function was further assessed by calculation of the ejection fraction.

Action potential recordings.

Action potentials (AP) from left atrial and right ventricular free wall were recorded at 37 ± 0.5°C with borosilicate glass microelectrodes with 15-25-MΩ impedance when filled with

3 mol/L KCl. The preparations were superfused with a modified Tyrode solution, bubbled with 95% O_2-5% CO_2 gas mixture. Preparations were paced locally with 2-ms square wave pulses with amplitude of twice diastolic threshold. The resting potential (RP), the AP amplitude (APA), the maximum upstroke velocity of phase 0 of the AP (dV/dt_{max}) and the AP duration at 30% (APD_{30}), 50% (APD_{50}), 70% (APD_{70}) and 90% (APD_{90}) of full repolarization were measured under baseline conditions and after 10 min of superfusion with ranolazine (10 µmol/L; Tocris Bioscience, UK).

Mathematical modeling of mouse ventricular action potentials

We used the 2001 single-cell mouse model of Pandit and collaborators (http://models.cellml.org/electrophysiology). For the *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ model, late current was assumed to represent 3% of the peak current[9] and both fast and slow steady-state inactivation curves were shifted by 6 mV to the depolarized potential, as experimentally observed (see figure 4C and supplementary material online, Supplemental table 1). Time constants of fast and slow inactivation, τ_h and τ_j respectively, were also modified (see figure 4D) and SERCA2 Ca^{2+} flux was reduced by 3 in order to correspond to the 3-fold increase of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay time (see figure 5A).

Patch-clamp experiments.

Whole-cell patch-clamp technique was used to record sodium current in 4-week-old mouse cardiomyocytes (see supplementary material online for cell isolation method) using a VE-2 amplifier (Alembic Instruments, Montreal, QC, Canada). Series resistance was compensated. Activation, inactivation, recovery from inactivation and slow inactivation parameters were determined at room temperature (20-22°C) using conventional voltage-clamp protocols, from a holding potential of -120 mV and in the presence of 14 mM external Na^+. All current measurements were normalized using the cell capacitance. Late sodium current was measured in the presence of 140 mM external Na^+ as the 30 µmol/L tetrodotoxin-sensitive current at the end of a 350-ms step at -20 mV.

Calcium imaging.

$[Ca^{2+}]_i$ transients and Ca^{2+} sparks were recorded in 4-week-old mouse cardiomyocytes (see supplementary material online for cell isolation method) loaded for 30 minutes with fluorescent Ca^{2+} dye (Fluo-3 AM, 5 µmol/L) and superfused with a control solution. To record $[Ca^{2+}]_i$ transients, cells were paced at 0.5 Hz by field stimulation. Spontaneous Ca^{2+} sparks were obtained in quiescent cells after $[Ca^{2+}]_i$ transients recordings. SR Ca^{2+} load was estimated by rapid caffeine application. Images were obtained with confocal microscopy. The line scan was selected parallel to the longitudinal cell axis. The fluorescence values (F) were normalized by the basal fluorescence (F_0) in order to obtain the fluorescence ratio (F/F_0).

Statistics.

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical analysis was performed with Prism5 (GraphPad Software, Inc.). Significant differences were determined with Student *t*-test or Mann-Whitney U test for comparison of two groups. Wilcoxon test was used to compare paired values. Kaplan-Meier analysis and log-rank test were used to compare the survival distributions. For more than two groups, 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed with Bonferroni or Dunn post-test when appropriate. For percentage comparison, Fisher exact test was used. A *P* value below 0.05 was considered significance.

3. Results

Scn5a$^{+/+}$*-Flp* and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP\text{-neo}}$ mice developed normally. Western blot analysis showed no appreciable difference in ventricular expression of Nav1.5 protein between *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice and WT mice (supplementary material online, Figure S2). Since no parameter allowed to discriminate WT mice from *Scn5a*$^{+/+}$*-Flp* mice, we pooled these two groups in a single *Scn5a*$^{+/+}$ group (see below and supplementary material online, Figure S3).

3.1 Electrocardiographic phenotype and premature mortality in Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ *mice

Figure 1A depicts representative examples of ECG recordings in 3-week-old anesthetized mice. Only about 20% (22/102) of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice were in sinus rhythm. In these mice, RR interval did not differ from that in *Scn5a*$^{+/+}$ mice. However, they exhibited a marked prolongation of QTc interval (73.8 ± 2.7 ms; n = 22) compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (47.7 ± 0.4 ms; n = 142; p< 0.001, Student *t*-test). Ventricular conduction as reflected by QRS interval was also prolonged in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (Figure 1B), while atrial and

atrioventricular conduction was not altered. Most 3-week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibited rhythm disorders. Indeed, functional second-degree atrioventricular block (fAVB), resulting from prolonged ventricular repolarization and refractoriness, occurred in ~30% of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (32/102; Figure 1C). Spontaneous episodes of monomorphic and polymorphic premature ventricular beats and/or tachycardia (PVB/VT) were also observed in ~50% of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (48 out of 102), whereas this was almost absent in *Scn5a*$^{+/+}$ mice (1/142; Figure 1D). Prolonged QT interval and arrhythmias were already present at the age of 2 weeks (supplementary material online, Figure S4), with 30% of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibiting fAVB and 30% PVB/VT. One event of lethal ventricular fibrillation was recorded in a 4-week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse (Figure 1E). We did not observe any atrial arrhythmia. In accordance with the pathology observed in patients, *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice displayed shortened life expectancy compared to control mice (median survival: 6.4 weeks; Figure 1F), without any difference between males and females. The proportion of mice exhibiting tachyarrhythmias and AVB progressively decreased with ageing, suggesting that only mice in sinus rhythm survived (supplementary material online, Figure S5).

3.2 Abnormal cardiac function in Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice

Heterozygous *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ offspring were born at a Mendelian frequency. At weaning (3-week old), they presented a small but significant decrease in body weight compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (Figure 2A). This difference was already observed at the age of 2 weeks (supplementary material online, Figure S4E). *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice also displayed typical symptoms of congestive heart failure. Morphological examinations of whole hearts and longitudinal sections from *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice indicated increased chamber dimensions compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice at 4 weeks of age (Figure 2B). This is linked at the cellular level to a disorganization of both α-actinin 2 and t-tubule network at the same age in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (supplementary material online, Figure S6). Consistently, heart weight/tibia length ratio was significantly higher in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice at 4 weeks (Figure 2B). *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice also exhibited cardiomyocytes hypertrophy, as indicated by their larger cell capacitance (supplementary material online, Table S1). However, the increase in the left ventricle thickness was not significant at this age on the histological sections (supplementary material online, Figure S7A). At the same age, the echocardiography results show that both the septum and left ventricle free wall thickness was already increased, probably due to incomplete

relaxation of the beating heart (supplementary material online, Figure S7A and B). At the age of 10 weeks, this increase was also observed on the histological sections (supplementary material online, Figure S7A). In addition, the atria of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice frequently contained organized thrombi. Lung weight/tibia length ratio was increased in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice but neither pulmonary congestion nor edema was observed (Figure 2C). Regarding the right ventricular dysfunction, no significant alteration of the liver weight/tibia length was detected (data not shown). However, histological analysis showed chronic congestive liver with blood stasis in the capillary vessels between centroglobular and periglobular veins in all *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice but not in *Scn5a*$^{+/+}$ littermates (Figure 2D). No cardiomyopathic changes were observed at the age of 2 weeks (supplementary material online, Figures S4E and S7A), which is consistent with the absence of disorganization of both α-actinin 2 and t-tubule network at this age (supplementary material online, Figure S6B and S6C).

3.3 Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibit prolonged action potentials

Ventricular action potential duration (APD) was dramatically prolonged in 4-week *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (Figure 3A) at a pacing cycle length of 200 ms. *In silico* modelling showed that it may be also the case at shorter pacing cycle lengths (100 ms, Figure S8). Ventricular preparations from *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice displayed a depolarized resting membrane potential and a lower action potential (AP) amplitude compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (Figure 3B). There was also a 35% decrease in dV/dt_{max} in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ preparations compared to *Scn5a*$^{+/+}$ preparations (104 ± 20 V/s, n = 8, *versus* 159 ± 8 V/s, n = 8, respectively, $P < 0.05$, Student *t*-test). *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibited prolonged APD_{30}, APD_{50}, APD_{70} and APD_{90} with respect to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (Figure 3C). Ranolazine (10 µmol/L), which inhibits $I_{Na,L}$, reduced APD_{70} and APD_{90} in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (Figure 3D). Resting membrane potential was also depolarized and AP durations prolonged in left atrial *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ preparations (supplementary material online, Figure S9).

3.4 Occurrence of a late Na$^+$ current in Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice

Figure 4A displays representative Na^+ currents recorded from *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. Peak current density was not affected by the QKP deletion (Figure 4B) nor was the steady-state activation voltage dependence (Figure 4C and supplementary material online, Table S1). Consistent with unchanged peak current density, the expression of Nav1.5

protein, tested by immunoblotting, showed no appreciable difference between *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ and *Scn5a*$^{+/+}$ mice (supplementary material online, Figure S2). Steady-state inactivation was significantly shifted toward depolarized potentials in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes (Figure 4C and supplementary material online, Table S1). As a consequence, the window current was increased. In addition, the slow and fast time constants of inactivation were significantly higher in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes (Figure 4D). However, recovery from inactivation was similar between the two groups (supplementary material online, Figure S10 and Table S1). Finally, the TTX-sensitive late Na^+ current measured at the end of a 350-ms depolarizing step was much larger in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes (Figure 4E).

3.5 Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ *mutation induces pro-arrhythmic calcium homeostasis changes*

In the heart, intracellular Na^+ concentration is a key modulator of Ca^{2+} homeostasis and increased intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) has been closely linked to arrhythmias.[10] We thus investigated the $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis in ventricular cardiomyocytes to detect any additional impairment. Figure 5A shows representative confocal line-scan images recorded from *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes that were field stimulated at 0.5 Hz. Higher amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ transients were observed in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes accompanied by prolonged time-to-peak and decay time (Figure 5A). The slower $[Ca^{2+}]_i$ transient decay might result from the alteration of SERCA2 (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-ATPase) or NCX1 (sodium/calcium exchanger) activities. SERCA2 (Figure 5B*;* left) and NCX1 (Figure 5C) expression were similar in both groups. Since SERCA2 activity is regulated by phospholamban (PLB), expression and phosphorylation of PLB were tested by immunoblotting. PLB expression was significantly higher in ventricle. Moreover, its CaMKII-dependent phosphorylation at Thr17 was significantly lower in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice (Figure 5B; right). These alterations may underlie the prolongation of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay phase. It has to be noticed though that these modifications were absent at 2 weeks of age (supplementary material online, Figure S11A-C).

To investigate the mechanism involved in the enhanced $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude and time-to-peak, we evaluated the expression of the ryanodine receptor (RyR2) and the amount of Ca^{2+} stored in the sarcoplasmic reticulum (SR). RyR2 expression was not altered in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. However, its level of CaMKII-dependent phosphorylation at Ser2808 and Ser2814 was lower (Figure 5D), which could explain the prolongation of the $[Ca^{2+}]_i$ transient

time-to-peak. Ca^{2+} release in each twitch depends on the amount of Ca^{2+} stored in the SR. The *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes presented higher SR Ca^{2+} load (Figure 5E) without alterations of decay time of the caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients (4208 ± 651 ms, n = 6 *versus* 4210 ± 656 ms in *Scn5a*$^{+/+}$ mice, n = 12), consistent with the absence of alterations in NCX1 expression, as described above. Again, no difference was detected at the age of 2 weeks (supplementary material online, Figure S11).

We also used the *in silico* model to further analyze the $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis. The model predicts that the mutation leads to both higher diastolic $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude at 2000-ms cycle length, in agreement with the experimental results (supplementary material online, Figure S8). The model also allows to simulate the effects of the mutation on Ca^{2+} homeostasis at more physiological cycle lengths. In these conditions, both $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude and diastolic $[Ca^{2+}]_i$. elevations are exacerbated even if the SR Ca^{2+} load is predicted to be lower (supplementary material online, 100 and 200 ms, Figure S8).

3.6 Activated forms of CaMKII are reduced in Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice

Recent studies have linked $I_{Na,L}$ with higher activity of CaMKII.[11] As shown in Figure 6A, no significant difference in CaMKII ventricular expression was observed between *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ and *Scn5a*$^{+/+}$ mice, despite a slightly higher expression at 2 weeks of age (supplementary material online, Figure S11D). However, using an antibody against phosphoThr287-CaMKII, the active form of CaMKII, we found that CaMKII autophosphorylation (T287) in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice was lower compared to *Scn5a*$^{+/+}$ mice at 4 weeks (Figure 6A), but not at the age of 2 weeks (supplementary material online, Figure S11D), consistent with the lower PLB and RyR2 phosphorylation. We also observed that the level of CaMKII oxidation (Met281-282) was also lower in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice, confirming lower activity of CaMKII in this model. Because autophosphorylation and oxidation of CaMKII first require the formation of a Ca^{2+}-calmodulin/CaMKII complex, we investigated the expression of calmodulin and found that it was significantly lower in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (Figure 6B) but, again, only at the age of 4 weeks (supplementary material online, Figure S11E).

3.7 Early afterdepolarizations and calcium waves in Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice.

To decipher the involvement of the defective $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis in ventricular arrhythmias observed in 4 week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice, we recorded Ca^{2+} activity in quiescent

cardiomyocytes (Figure 6C). The percentage of cardiomyocytes exhibiting spontaneous Ca^{2+} waves and the frequency of Ca^{2+} waves were higher in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice than in *Scn5a*$^{+/+}$ mice, accompanied by a faster propagation speed (139.9 ± 2.6 µm/s, n = 99 *versus* 92.7 ± 6.6 µm/s, n = 10; P< 0.001). However, no change in Ca^{2+} wave amplitude was observed (peak F/F0, 2.6 ± 0.1, n = 101 *versus* 2.7 ± 0.1, n = 10). To analyze arrhythmogenic elementary Ca^{2+} release through RyR2 channels, we recorded spontaneous Ca^{2+} sparks in quiescent conditions. Although the mutation had no effect on Ca^{2+} spark frequency [in s^{-1}.100 μm^{-1}, 0.3 ± 0.1 (10 *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes) *versus* 0.5 ± 0.1 (20 *Scn5a*$^{+/+}$ cardiomyocytes)], Ca^{2+} sparks in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes were higher (peak F/F_0, 2.3 ± 0.1 *versus* 1.9 ± 0.1; P< 0.01), wider (full width at half-maximum amplitude in µm, 3.1 ± 0.2 *versus* 2.0 ± 0.1; P< 0.001) and longer (full duration at half-maximum peak in ms, 47.8 ± 3.6 *versus* 35.8 ± 2.4; P< 0.01, 66 from *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes *versus* 152 from *Scn5a*$^{+/+}$ cardiomyocytes). Action potential prolongation was associated with the occurrence of early afterdepolarizations in 9 out of 17 *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ ventricular preparations but in none of the *Scn5a*$^{+/+}$ preparations (Figure 6D, see also supplementary material online, Figure S8A).

3.8 Acute pharmacological treatment of Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice

Beta-blockers are commonly used for treating heart failure[12] and long QT syndrome.[13] Therefore, we evaluated the effects of propranolol *in vivo*. Acute propranolol injection (0.3-1-3 mg/kg) had no effect on the incidence of arrhythmias in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (Figure 7A). In contrast, acute injection of ranolazine (IP, 30 mg/kg) suppressed arrhythmias (Figure 7B) and significantly decreased QTc interval in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice, without affecting QRS duration (Figure 7C) or other ECG parameters (not shown). In *Scn5a*$^{+/+}$ mice, ranolazine had no effect on any ECG parameter (supplementary material online, Figure S12). *Ex vivo*, the shortening of APD by ranolazine (10 µmol/L, see above and Figure 3D) was associated with a decrease in early afterdepolarizations (Figure 7D).

4. Discussion

We have generated a knock-in mouse model carrying the delQKP1510-1512 mutation on *Scn5a* gene, a mutation equivalent to the *SCN5A*-delQKP1507-1509 mutation identified in LQTS3 patients.[5,6] Our study shows that 1) this model recapitulates the patients' clinical traits,

i.e. prolonged ventricular repolarization, conduction disorders, ventricular arrhythmias, cardiac failure and a high incidence of premature death; 2) the mutation-induced Nav1.5 biophysical alterations are different from those previously reported in an heterologous expression system[5] and lead to larger late and window Na^+ currents; 3) the Nav1.5 functional defect is associated with a decreased CaMKII phosphorylation; 4) the dysfunction of Nav1.5 leads to arrhythmias, which precede structural defects and Ca^{2+} handling abnormalities, including CaMKII downregulation; 5) ranolazine, an inhibitor of $I_{Na,L}$, partially normalizes repolarization of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice and suppresses arrhythmias.

The *SCN5A*-delQKP1507–1509 mutation was identified in two families. In the first one,[5] the variant induced a QT prolongation, bradycardia and a PR interval prolongation to borderline values but neither arrhythmias, nor structural heart disease. In the second family,[6] the phenotype was more severe with marked QT prolongation, conduction disorders, *torsades de pointes*, ventricular fibrillation and a high incidence of sudden death. In addition, the surviving mutation carriers were diagnosed with DCM. Our study shows that *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibit a similar phenotype to that of the second family, with a markedly prolonged QT interval associated with either 2:1 AVB or numerous episodes of ventricular tachycardia in a majority of mice. AVB was due to a particularly prolonged ventricular refractoriness, as evidenced on the ECG recordings (Figure 1C) by P waves preceding the T waves, rather than a true AV block that is localized in the AV node. In addition, this model is characterized by high mortality at young age and signs of heart failure. The high incidence of tachyarrhythmias in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice could account for the premature death, as supported by one recorded fatal event of ventricular fibrillation. Alternatively, cardiac failure cannot be excluded as the mechanism of death.

Several LQTS3 mouse models have already been developed. In a transgenic mouse model with cardiac selective expression of human N1325S-*SCN5A*,[14] ventricular tachycardia and fibrillation were clearly shown to induce sudden death. However, arrhythmias occurred in much older mice than in our model. Interestingly, this model also showed left ventricular systolic dysfunction.[15] Knock-in mice carrying *Scn5a*-delKPQ1508-1510 mutation (equivalent to human "historical" delKPQ1505-1507 mutation) also showed spontaneous episodes of ventricular tachycardia but only a very small fraction (6/275) of these mice died suddenly, at the age of 3 to 6 months, much later than in our model.[16] The death was attributed to fatal

arrhythmias but was not documented. Thus, in contrast to previous LQTS3 mouse models, *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibit a severe phenotype characterized by a high incidence of arrhythmias and premature death before adulthood.

Mechanisms of cardiac structural and functional defects

Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice clearly show anomalies of cardiac structure and mechanical function, *e.g.*, cardiomyocytes hypertrophy, right ventricular dilation, histological signs of congestive liver,[17] organized thrombi in left atrium[18] and increased lung weight, which has been reported as a sign of heart failure in $N_{1325}S$ mice.[13] This phenotype is consistent with the DCM observed in some human mutation carriers.[6] Another *SCN5A* mutation leading to the deletion of phenylalanine in position 1486 has also been associated with LQTS, severe arrhythmias and reduced left ventricular function.[19] In contrast, no sign of heart failure has been reported for the classical *Scn5a*-delKPQ1508-1510 mutation in mice.[14] Nevertheless, our model and $N_{1325}S$ mice exhibit differences. For instance, $N_{1325}S$ mice are characterized by a marked cardiac fibrosis, which was not observed in our model. Moreover, the age of development of the structural disease is much older in $N_{1325}S$ mice. These differences suggest that the disease in the two models might involve different mechanisms. In the present study, cardiac insufficiency is most likely secondary to arrhythmias, since the arrhythmias are already present at the age of two weeks when cardiac structure remains normal. This hypothesis is consistent with the fact that surviving *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice in sinus rhythm exhibit only a moderate left ventricular hypertrophy at the age of 10 weeks.

Noteworthy *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice do not recapitulate the classical alterations of Ca^{2+} homeostasis found in heart failure, namely the characteristic decrease in $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude, together with increased activation of CaMKII and RyR2 phosphorylation. *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice show almost the opposite, as we found increased $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitudes and lower of CaMKII and RyR2 phosphorylation. These effects may be due to the enhanced Na^+ entry through the mutated channels and decreased SERCA2 activity. First of all, the slowed I_{Na} inactivation, without alteration in the peak current, increases the total amount of Na^+ entry in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. It has been shown that during the first part of the AP, the large Na^+ current activates NCX1 in reverse mode, contributing to triggering $[Ca^{2+}]_i$ transient.[20,21] Thus the larger $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice can be explained by larger

amount of Na^+ entry through the Na^+ channel at each twitch. Moreover, $I_{Na,L}$, together with the increased Na^+ window current, activate NCX1 in reverse mode. It is important to note that both $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude and SR Ca^{2+} load depend on the pacing. Thus although the SERCA2 works slower in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice cells, it has enough time to refill the SR during the diastolic period at low pacing rate. Unfortunately, we could not use pacing frequencies higher than 0.5 Hz at 25°C or 5 Hz at 37°C, because the *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ failed to respond to higher frequencies, due to prolonged AP duration. However, *in silico* simulation of the mutation let us suggest that the increased I_{NaL} leads to prolonged AP and high levels of both diastolic and peak $[Ca^{2+}]_i$. Those predictions are obtained not only when the model functions at a cycle length of 2 000 ms, but also at more physiological cycle lengths of 200 ms and 100 ms. However, at these higher frequencies, the lower SERCA2 activity may prevent SR Ca^{2+} overload.

The $[Ca^{2+}]_i$ transients kinetics were slower in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice than in controls. The longer time to peak could be due to the AP prolongation that would trigger Ca^{2+} release for longer time (by both L type Ca^{2+} channels and NCX1 reverse mode). Alternatively, it can be ascribed to poor excitation-contraction coupling due to transverse tubule disorganization in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice, as observed in experimental models of hypertrophy.[22] Structural remodeling could result from cytoskeletal perturbation secondary to abnormal interactions between Nav1.5 and cytoskeletal proteins. Indeed, QKP amino acids are located near α-actinin-2 interaction site of Nav1.5, and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice clearly show a disorganized α-actinin 2 network, at both cellular level and on heart sections.[23] Interestingly, mutations in α-actinin-2 have been previously shown to induce both hypertrophic cardiomyopathy and ventricular arrhythmias.[24]

The slowing of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay time may be explained by a decrease in phospholamban phosphorylation. Thus, from the Ca^{2+} point of view, the alterations found in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice are more consistent with heart failure with preserved ejection fraction than with impaired systolic function, as also suggested by the echocardiographic results.

In addition, one of the main effectors of Ca^{2+} signaling alteration in heart failure, CaMKII,[25] showed a decreased activation in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. The CaMKII activator is the Ca^{2+}-calmodulin complex.[26] In our model, calmodulin expression is decreased. Although this might result as an adaptation to the increased Ca^{2+} influx during prolonged AP, one could hypothesize that calmodulin-Nav1.5 interaction could be implicated in the process. Calmodulin is known to be linked to Nav1.5 by interacting with its DIII–DIV intracellular loop[27]

and QKP amino acids are located within the interaction domain of calmodulin with Nav1.5.[28] Therefore, the QKP deletion could also alter calmodulin binding to Nav1.5, resulting in defective Ca^{2+} signaling pathways.

Finally, although this does not preclude previous hypotheses, we cannot exclude the potential contribution of incessant tachyarrhythmias to the development of contractile dysfunction in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice, as shown recently for the *SCN5A*-R222Q mutation by our group.[29]

Arrhythmogenic mechanisms involve both late Na^+ current and abnormal Ca^{2+}-cycling

Our study confirms that the mutation induces a late Na^+ current as previously described in a heterologous expression system.[5] But, in contrast to this previous study, we did not observe a shift of steady-state activation towards positive voltages and faster recovery from inactivation. Moreover, we recorded a non-previously described shift of steady-state inactivation towards positive voltages, which is consistent with the implication of DIII-DIV loop in inactivation process[30] and responsible for a larger Na^+ window current. Discrepancies between heterologous expression systems and cardiomyocytes isolated from knock-in mice were previously reported,[31,32] and the mouse models appeared to be more useful to elucidate the pathophysiological mechanisms of the studied *SCN5A*-related diseases. The larger $I_{Na,L}$ and Na^+ window currents observed in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice are responsible for AP prolongation and development of early afterdepolarizations, a likely trigger for arrhythmias.[33] This is consistent with other *SCN5A* mutations involved in LQTS3.[2,34,35] Moreover, the induced Na^+ overload can contribute to the Ca^{2+} overload we observed, which may underlie arrhythmogenic Ca^{2+} waves. Eisner *et al.*, showed that $[Ca^{2+}]_i$ varies as a power function of $[Na^+]_i$.[36] Consequently any increase in $[Na^+]_i$ may cause a large increase in $[Ca^{2+}]_i$ leading to Ca^{2+} waves. The higher propensity to Ca^{2+} waves may also depend on the higher $[Ca^{2+}]_i$, which would favor RyR2 openings. This is, however, not associated with any significant increase in the frequency of Ca^{2+} sparks. Nonetheless, once RyRs open, the probability to provoke an arrhythmogenic Ca^{2+} wave is enhanced as, individually, each Ca^{2+} spark releases more Ca^{2+}. Consistent with this, Ca^{2+} spark amplitude is increased in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes, favoring activation of neighboring clusters and wave generation, leading to faster wave propagation, as observed.

Ranolazine but not β-blockers suppresses spontaneous arrhythmias in Scn5a$^{+/\Delta QKP}$ mice

In addition to its antianginal action, ranolazine is a $I_{Na,L}$ inhibitor known to reduce QTc interval, and to suppress early afterdepolarizations and *torsades de pointes*.[37] Our study shows that acute ranolazine shortens QTc and normalizes heart rhythm of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. In contrast to other Nav1.5 blockers, ranolazine does not affect QRS duration in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. Similarly, Moss *et al.* showed that ranolazine shortens QTc interval and improves diastolic dysfunction in LQTS3 patients, without affecting ventricular conduction.[38] Moreover ranolazine may also exert an antiarrhythmic effect by inhibiting Na^+ overload, which would prevent $[Ca^{2+}]_i$ increase.

The recent guidelines for LQTS management indicate that β-blockers represent the first way to use for patients.[11] Beta-blockers, associated with ACE inhibitors in the majority of cases, are also recommended for heart failure treatment.[10] In our study, propranolol alone had no beneficial effects on ventricular arrhythmias, which is consistent with the fact that management of LQTS3 patients is more complex than other LQTS patients (*i.e.* LQTS1). In fact, in LQTS3 patients, bisoprolol alone has no beneficial effects, but significantly reduces arrhythmias when associated with ranolazine.[39] This effect might be directly linked to the inhibition of $I_{Na,L}$ and secondary shortening of repolarization, but also to a decrease of Ca^{2+} overload as shown in *Scn5a*-delKPQ1507-1509 mutation.[40] Whether chronic treatment with ranolazine in our model could prevent remodeling of Ca^{2+} handling proteins and cardiac insufficiency remains to be investigated. Such study could also confirm or refute our hypothesis of altered Nav1.5-cytoskeletal proteins interaction as the mechanism of DCM. The main advantages of our model are the severity and the rapid onset of the disease, which should facilitate pharmacological investigations not only for deciphering the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related DCM, but also for preclinical screening of new antiarrhythmic drugs or late Na^+ current inhibitors.

To conclude, *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice recapitulate the clinical phenotype of patients carrying the equivalent mutation, including QT prolongation, ventricular arrhythmias and heart failure. Interestingly, the Nav1.5 functional defect is associated with a decreased CaMKII phosphorylation. The dysfunction of Nav1.5 leads to arrhythmias, which precede structural defects and Ca^{2+} handling abnormalities. This mouse model constitutes a useful tool for preclinical screening of $I_{Na,L}$ inhibitors.

Acknowledgements

The authors wish to thank Stéphanie Lemarchand-Mindé and Valentine Prat (Inserm UMR S1087), as well as Florence Lefèbvre (Inserm UMR S1180) for their expert technical assistance. The authors also thank the staff of the animal facility (UTE IRS-UN) and of the cell and tissue imaging core facility (MicroPICell) of the *SFR François Bonamy*. UMR S1180 is member of the Labex Lermit supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (10-LABX-33).

Conflict of interest: none declared.

Funding

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No. HEALTH-F2-2009-241526, EUTrigTreat (IB, FC). It was also funded by the *Agence Nationale de la Recherche* [ANR-13-BSV1-0023-01 to AMG, ANR-09-GENO-003-01 to IB, ANR-12-BSV1-0013-01 to FC].

References

1. Amin AS, Pinto YM, Wilde AAM. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol (Lond)*. 2013;**591**:4125–4139.
2. Wang DW, Yazawa K, George AL, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na^+ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Nat Acad Sci*. 1996;**93**:13200–13205.
3. Kambouris NG, Nuss HB, Johns DC, Tomaselli GF, Marban E, Balser JR. Phenotypic Characterization of a Novel Long-QT Syndrome Mutation (R1623Q) in the Cardiac Sodium Channel. *Circulation*. 1998;**97**:640–644.
4. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*. 1995;**376**:683–685.
5. Keller DI, Acharfi S, Delacrétaz E, Benammar N, Rotter M, Pfammatter JP, Fressart V, Guicheney P, Chahine M. A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507-1509, causing long QT syndrome: role of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;**35**:1513–21.
6. Shi R, Zhang Y, Yang C, Huang C, Zhou X, Qiang H, Grace AA, Huang CLH, Ma A. The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death. *Europace*. 2008;**10**:1329–1335.
7. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni A-L, Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;**111**:1738–1746.
8. Wagner E, Brandenburg S, Kohl T, Lehnart SE. Analysis of tubular membrane networks in cardiac myocytes from atria and ventricles. *J Vis Exp*. 2014;**(92)**:e51823
9. Wang DW, Yazawa K, George AL Jr, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na^+ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

1996;**93(23)**:13200-5.

10. Despa S, Bers DM. Na^+ transport in the normal and failing heart - Remember the balance. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;**61**:2–10.
11. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^+ channels. *J Clin Invest*. 2006;**116**:3127-3138.
12. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012;**33**:1787–1847.
13. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang C-E, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C. HRS/EHRA/APHRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm*. 2013;**10**:1932–1963.
14. Tian X-L, Yong SL, Wan X, Wu L, Chung MK, Tchou PJ, Rosenbaum DS, Van Wagoner DR, Kirsch GE, Wang Q. Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc Res*. 2004;**61**:256–267.
15. Zhang T, Yong SL, Drinko JK, Popović ZB, Shryock JC, Belardinelli L, Wang QK. LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene SCN5A causes cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int J Cardiol*. 2011;**147**:239–245
16. Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compernolle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet P. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med.* 2001;**7**:1021–1027.

17. Moller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J*. 2013;**34**:2804–2811.

18. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN. Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein Kinase A. *Circ Res*. 2001;**89**:997–1004.

19. Yamamura K, Muneuchi J, Uike K, Ikeda K, Inoue H, Takahata Y, Shiokawa Y, Yoshikane Y, Makiyama T, Horie M, Hara T. A novel SCN5A mutation associated with the linker between III and IV domains of Nav1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. *Int J Cardiol*. 2010;**145**:61–64.

20. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low Efficiency of Ca2+ Entry Through the Na^{+}-Ca^{2+} Exchanger as Trigger for Ca^{2+} Release From the Sarcoplasmic Reticulum : A Comparison Between L-Type Ca^{2+} Current and Reverse-Mode Na+-Ca2+ Exchange. *Circ Res*. 1997;**81**:1034–1044.

21. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;**70**:23–49.

22. Bénitah J-P, Kerfant BG, Vassort G, Richard S, Gómez AM. Altered communication between L-type calcium channels and ryanodine receptors in heart failure. *Front Biosci*. 2002;**7**:e263–75.

23. Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. Cell Membrane Expression of Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Modulated by α-Actinin-2 Interaction. *Biochemistry*. 2010;**49**:166–178.

24. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, Jormakka M, Lind JM, Semsarian C. Mutations in Alpha-Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; **55**:1127–1135.

25. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res*. 2010;**61**:269–280.

26. Saucerman JJ, Bers DM. Calmodulin Mediates Differential Sensitivity of CaMKII and Calcineurin to Local Ca^{2+} in Cardiac Myocytes. *Biophys J*. 2008;**95**:4597–4612.

27. Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K, Nagayama K. Novel Interaction of the Voltage-Dependent Sodium Channel (VDSC) with Calmodulin: Does VDSC Acquire Calmodulin-Mediated Ca^{2+}-Sensitivity? *Biochemistry*. 2000;**39**:1316–1323.

28. Mruk K, Farley BM, Ritacco AW, Kobertz WR. Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J Gen Physiol.* 2014;**144**:105–114.

29. Laurent G, Saal S, Amarouch MY, Béziau DM, Marsman RFJ, Faivre L, Barc J, Dina C, Bertaux G, Barthez O, Thauvin-Robinet C, Charron P, Fressart V, Maltret A, Villain E, Baron E, Mérot J, Turpault R, Coudière Y, Charpentier F, Schott J-J, Loussouarn G, Wilde AAM, Wolf J-E, Baró I, Kyndt F, Probst V. Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions. *J Am Coll Cardiol.* 2012;**60**:144–156.

30. Ulbricht W. Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiol Rev.* 2005;**85**:1271–1301.

31. Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, van Ginneken ACG, van Brunschot S, Belterman CNW, Wilders R, van Roon MA, Tan HL, Wilde AAM, Carmeliet P, de Bakker JMT, Veldkamp MW, Bezzina CR. Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation*. 2006;**114**:2584–2594.

32. Watanabe H, Yang T, Stroud DM, Lowe JS, Harris L, Atack TC, Wang DW, Hipkens SB, Leake B, Hall L, Kupershmidt S, Chopra N, Magnuson MA, Tanabe N, Knollmann BC, George AL, Roden DM. Striking *In Vivo* Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes *in Vitro*. *Circulation*. 2011;**124**:1001–1011.

33. Derangeon M, Montnach J, Baró I, Charpentier F. Mouse Models of SCN5A-Related Cardiac Arrhythmias. *Front Physiol*. 2012;**3**:210.

34. Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, Kirsch GE. Multiple Mechanisms of Na^+ Channel Linked Long-QT Syndrome. *Circ Res*. 1996;**78**:916–924.

35. Wehrens XHT, Rossenbacker T, Jongbloed RJ, Gewillig M, Heidbüchel H, Doevendans PA, Vos MA, Wellens HJJ, Kass RS. A Novel mutation L619F in the cardiac Na channel SCN5A associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Hum Mutat*. 2003;**21**:552–552.

36. Eisner DA, Lederer WJ, Vaughan-Jones RD. The quantitative relationship between twitch tension and intracellular sodium activity in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)*. 1984;**355**:251–266.

37. Antzelevitch C. Arrhythmogenic mechanisms of QT prolonging drugs: Is QT prolongation really the problem? *J Electrocardiol*. 2004;**37**:15–24.

38. Moss AJ, Zareba W, SCHWARZ KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine Shortens Repolarization in Patients with Sustained Inward Sodium Current Due to Type-3 Long-QT Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;**19**:1289–1293.

39. van den Berg MP, van den Heuvel F, van Tintelen JP, Volders PGA, van Gelder IC. Successful treatment of a patient with symptomatic long QT syndrome type 3 using ranolazine combined with a beta-blocker. *Int J Cardiol*. 2014;**171**:90–92.

40. Lindegger N, Hagen BM, Marks AR, Lederer WJ, Kass RS. Diastolic transient inward current in long QT syndrome type 3 is caused by Ca^{2+} overload and inhibited by ranolazine. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;**47**:326–334.

Figure legends

Figure 1: Ventricular arrhythmias, long QT interval and premature mortality in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. A. Representative lead-I ECGs from 3-week-old *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. Scale bars, 50 ms. **B**. Mean values for QTc and QRS intervals duration measured from ECGs recorded in 142 *Scn5a*$^{+/+}$and 22 *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. * P< 0.05, *** P< 0.001 (Mann-Whitney test). **C**. Top. Representative 2:1 functional atrioventricular block (fAVB) recorded in a *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse. Scale bar, 50 ms. Bottom. Incidence of fAVB in 3-week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ and *Scn5a*$^{+/+}$mice. *** P< 0.001 (Fisher exact test). **D**. Top. Representative episodes of ventricular tachycardia recorded in a *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse. Scale bar, 100 ms. Bottom. Incidence of premature ventricular beats and/or tachycardia (PVB/VT) in 3-week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ and *Scn5a*$^{+/+}$mice. *** P< 0.001 (Fisher exact test). **E**. Episode of ventricular fibrillation recorded in a 4-week-old *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse. Scale bar, 500 ms. **F**. Survival curves show a significant increase in premature mortality in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (n = 19) compared to *Scn5a*$^{+/+}$mice (n = 34; *** P< 0.001; Log-rank test).

Figure 2: Congestive heart failure in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. A. Mean values of body weight of 3-week-old *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 113) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 72) mice. *** P< 0.001 (Student t-test). **B**. Left. Representative histological sections of *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ hearts show increased right ventricular cavity and organized thrombi in the left atrium of the *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mouse. Scale bar, 1 mm. Right. Heart weight (mg) / tibia length (mm) ratio (HW/TL) in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 11) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 13) mice. *** P< 0.001 (Mann Whitney test). **C**. Left. Representative histological sections of *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ lungs do not show any differences. Scale bar, 100 µm. Right. Lung weight (mg) / tibia length (mm) ratio (LW/TL) in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 11) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 13) mice. *** P< 0.001 (Mann Whitney test). **D**. Representative histological sections of *Scn5a*$^{+/+}$and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ livers show chronic congestion in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice with blood stasis in capillary vessels. Scale bar, 100 µm.

Figure 3: *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibit prolonged action potentials. A. Representative ventricular action potentials (AP) from 4-week-old *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice recorded at a pacing cycle length of 200 ms. **B**. Mean values of resting membrane potential (RMP) and AP amplitude (APA) in *Scn5a*$^{+/+}$ (white bars; n = 8) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (black bars; n = 8) ventricular

preparations. * P< 0.05, (Student t-test). **C**. Mean values of ventricular AP duration at 30% (APD_{30}), 50% (APD_{50}), 70% (APD_{70}) and 90% (APD_{90}) of full repolarization in *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. ** P< 0.01, *** P< 0.001 (Student t-test). **D**. Left. Representative examples of ventricular APs in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice at a pacing cycle length of 200 ms before (baseline) and after 10-min superfusion of Ranolazine (10 µmol/L). Right. Mean values of APDs in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (n = 4) before and after ranolazine exposition. * P< 0.05 (Wilcoxon test).

Figure 4: Cardiac sodium current in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. A. Superimposed current recordings during depolarization to various potentials from -100 mV to +40 mV (100-ms duration, 5-mV increments every 5 s; holding potential: -120 mV) in *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. **B.** Current density-voltage relationships in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 11 from 6 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 9 from 6 mice) cardiomyocytes. **C.** Conductance-voltage relationships and steady-state channel availability curves in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 11-18 from 6-10 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 9 from 6 mice) cardiomyocytes. The data are mean normalized peak conductance at membrane potential (same protocol as in A) and mean normalized current measured during a -20-mV depolarizing pulse following a 350-ms prepulse to various potentials from -100 mV to -20 mV (frequency: 1/5 sec^{-1}). Curves: fits of the data to Boltzmann relationships. Inset: window current. **D.** Fast and slow inactivation kinetics in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 11 from 4 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 9 from 5 mice) cardiomyocytes. * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001 *versus* *Scn5a*$^{+/+}$ (Bonferroni test). **E.** Left. Representative late inward current traces obtained by subtraction of the current before and after application of 30 µmol/L tetrodotoxin (TTX) in *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. Right. Mean values of TTX-sensitive late sodium current measured at the end of a 350-ms step at -20 mV in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 6 from 5 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 6 from 3 mice) cardiomyocytes. * P< 0.05 (Mann-Whitney test).

Figure 5: *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibit calcium handling defects. A. Top. Representative line scan traces of $[Ca^{2+}]_i$ transients in *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ cardiomyocytes. Bottom. Mean amplitude (F/F_0), time to peak and decay time of the $[Ca^{2+}]_i$ transient (n = 20-21 cardiomyocytes from 4-3 mice). * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001 (Student *t*-test). **B.** Relative expression of sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2), phospholamban (PLB), and Thr17-phosphorylated PLB (pPLB-T17) *versus* glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 12-14) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 6-8) mice. *

P< 0.05 (Mann-Whitney test). **C.** Relative expression of sodium/calcium exchanger (NCX1) *versus* GAPDH in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 12) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 8) mice. **D.** Relative expression of ryanodine receptor (RyR2), Ser2808-phosphorylated RyR2 (pRyR2-S2808) and Ser2814-phosphorylated RyR2 (pRyR-S2814) *versus* GAPDH in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 8) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 8) mice. * P< 0.05 (Mann-Whitney test). **E.** Sarcoplasmic reticulum calcium load in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 14 from 4 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 7 from 3 mice) cardiomyocytes. ** P< 0.01 (Student *t*-test).

Figure 6: Reduced phosphorylation of Ca^{2+}-calmodulin dependent kinase II (CaMKII) associated with early afterdepolarizations and calcium waves in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. Relative expression of (**A**) CaMKII, Thr287-phosphorylated CaMKII (p-CaMKII), oxidized-CaMKII (oxCaMKII) and (**B**) calmodulin (CaM) *versus* GAPDH in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 12) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 6) mice. * P< 0.05 (Mann-Whitney test). **C.** Left. Representative line scan traces of calcium waves recorded in *Scn5a*$^{+/+}$ (n = 31 from 4 mice) and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ (n = 23 from 3 mice) cardiomyocytes. Right. Number of cardiomyocytes with waves (black) or without (white) waves (top), and wave frequency (bottom). ** P< 0.01 (Fisher exact test and Mann-Whitney test). **D**. Left. Example of early afterdepolarizations (EAD) observed in ventricular preparations from *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. Right. Number of *Scn5a*$^{+/+}$ and *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice exhibiting EADs (black) or not (white). ** P< 0.01 (Fisher exact test).

Figure 7: Acute pharmacological treatment of *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice. A. Left. Representative lead-I ECG at baseline and during propranolol treatment (IP, 0.3-1-3 mg/kg). Scale bar, 500 ms. Right. Incidence of premature ventricular beats and/or ventricular tachycardia (PVB/VT) in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (n = 9) at baseline and during propranolol treatment. **B.** Representative lead-I ECG at baseline and during ranolazine treatment (IP, 30 mg/kg). Scale bar, 500 ms. **C**. Mean values of QTc interval and QRS complex duration in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice (n = 14) at baseline and during ranolazine treatment. *** P< 0.001 (Wilcoxon test). **D.** Representative examples of ventricular EADs in *Scn5a*$^{+/\Delta QKP}$ mice at a pacing cycle length of 200 ms before (baseline) and after 10-min superfusion of ranolazine (10 µmol/L).

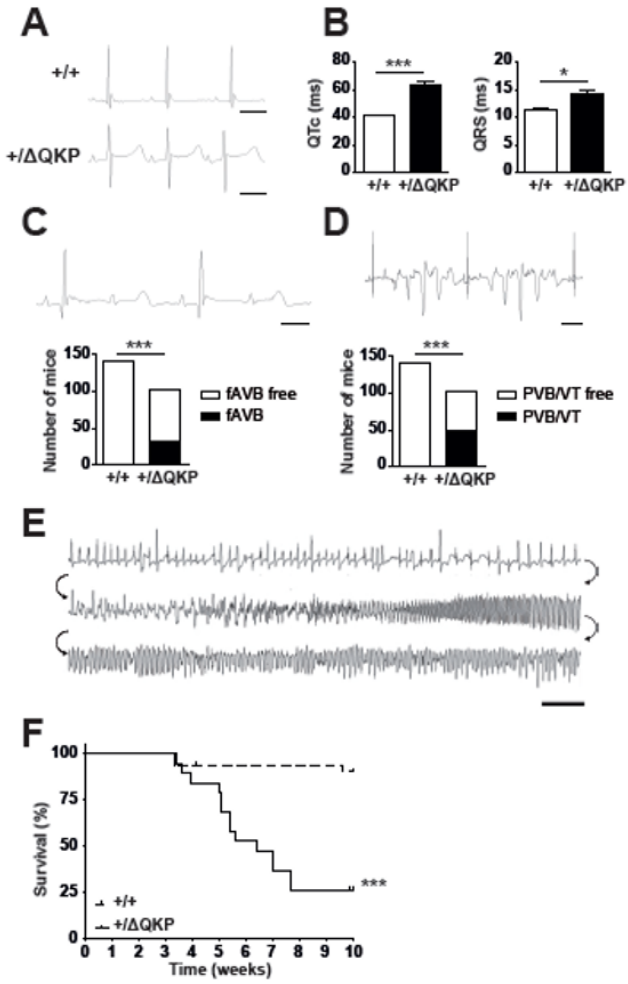

A
+/+
+/ΔQKP
B
QTc (ms)
***
+/+ +/ΔQKP
QRS (ms)
*
+/+ +/ΔQKP
C
Number of mice
***
fAVB free
fAVB
+/+ +/ΔQKP
D
Number of mice
***
PVB/VT free
PVB/VT
+/+ +/ΔQKP
E
F
Survival (%)
***
+/+
+/ΔQKP
Time (weeks)

Figure1

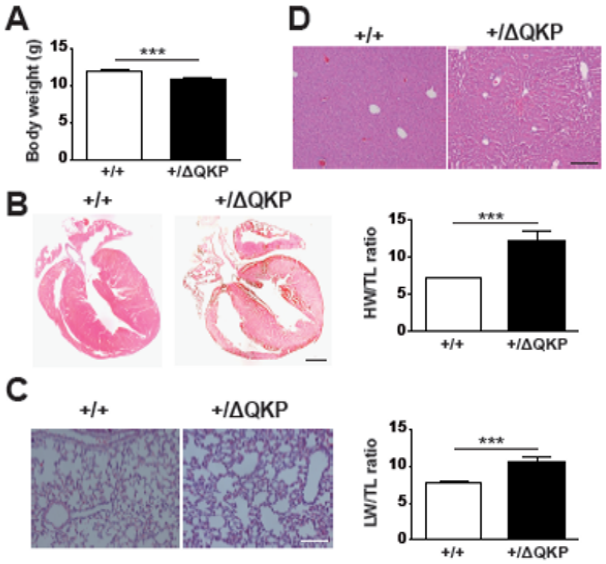

A
Body weight (g)
15
10
5
0
***
+/+
+/ΔQKP
D
+/+
+/ΔQKP
B
+/+
+/ΔQKP
HW/TL ratio
15
10
5
0
***
+/+
+/ΔQKP
C
+/+
+/ΔQKP
LW/TL ratio
15
10
5
0
***
+/+
+/ΔQKP

Figure 2

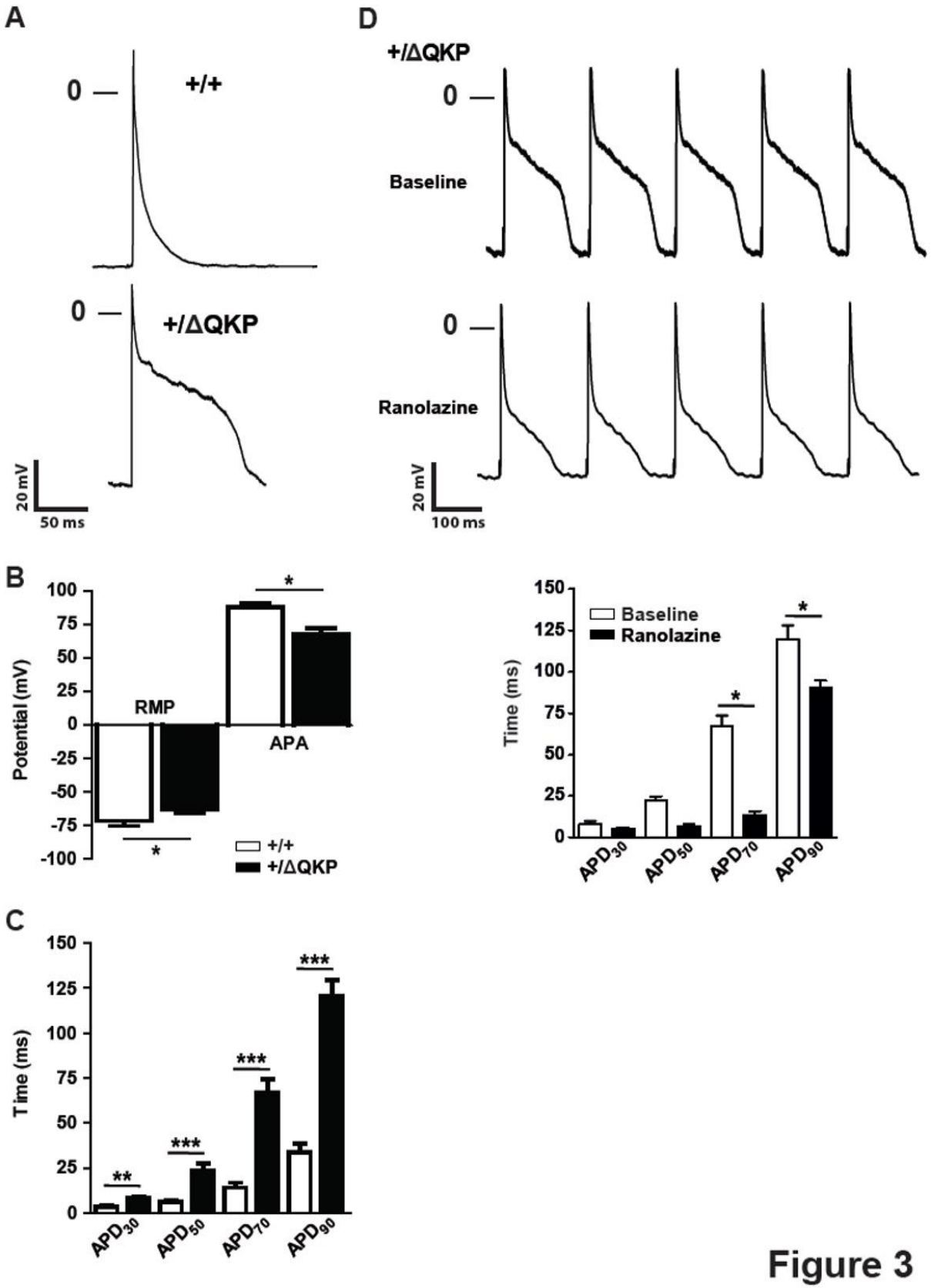

A
0
+/+
0
+/ΔQKP
20 mV
50 ms
D
+/ΔQKP
0
Baseline
0
Ranolazine
20 mV
100 ms
B
Potential (mV)
RMP
APA
+/+
+/ΔQKP
Time (ms)
Baseline
Ranolazine
APD30
APD50
APD70
APD90
C
Time (ms)
APD30
APD50
APD70
APD90

Figure 3

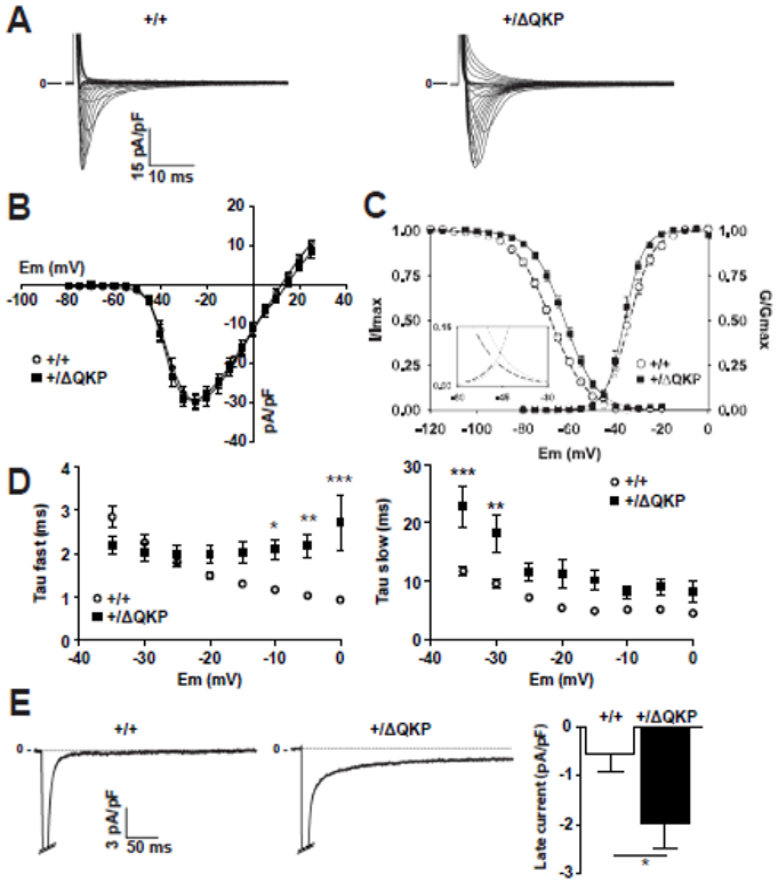

A
+/+
+/ΔQKP
15 pA/pF
10 ms
B
Em (mV)
+/+
+/ΔQKP
pA/pF
C
I/Imax
G/Gmax
+/+
+/ΔQKP
Em (mV)
D
Tau fast (ms)
Tau slow (ms)
+/+
+/ΔQKP
Em (mV)
E
+/+
+/ΔQKP
3 pA/pF
50 ms
Late current (pA/pF)

Figure 4

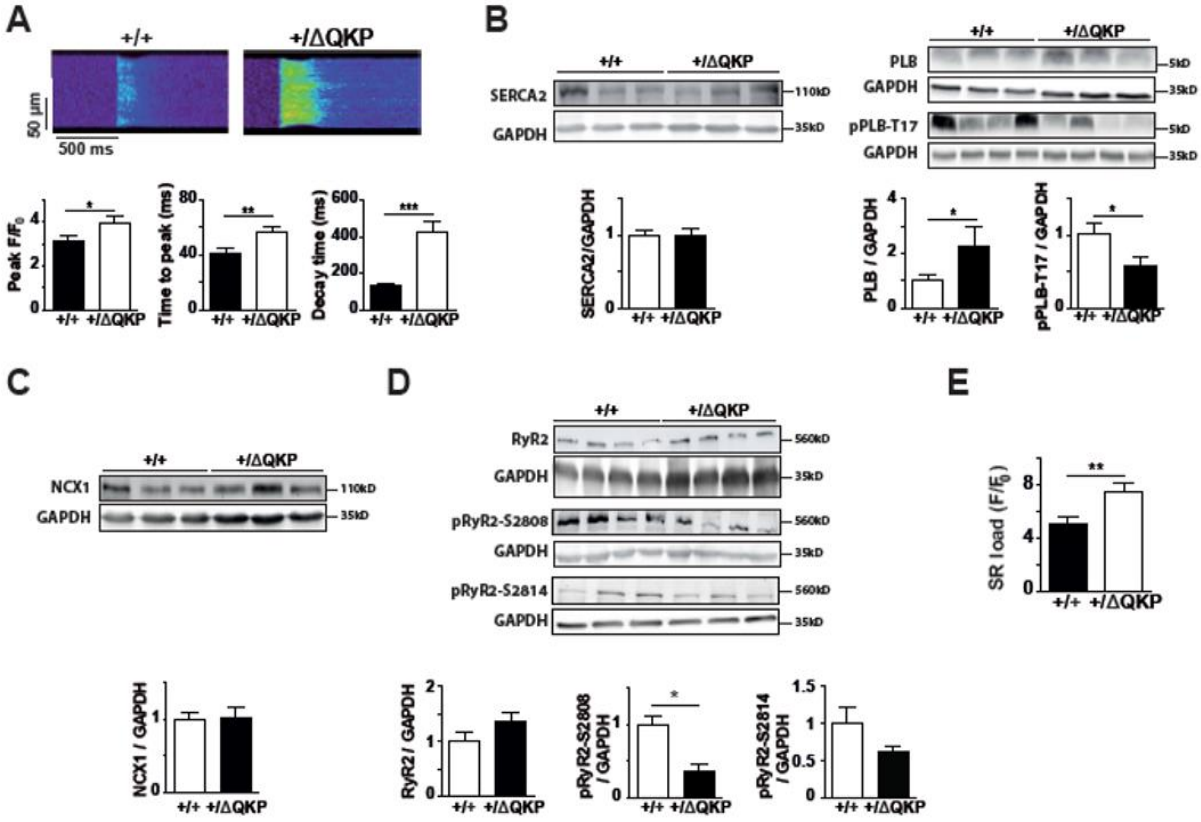

A
+/+
+/ΔQKP
50 µm
500 ms
Peak F/F0
Time to peak (ms)
Decay time (ms)
B
SERCA2
GAPDH
110kD
35kD
SERCA2/GAPDH
PLB
pPLB-T17
5kD
PLB / GAPDH
pPLB-T17 / GAPDH
C
NCX1
NCX1 / GAPDH
D
RyR2
pRyR2-S2808
pRyR2-S2814
560kD
RyR2 / GAPDH
pRyR2-S2808 / GAPDH
pRyR2-S2814 / GAPDH
E
SR load (F/F0)

Figure 5

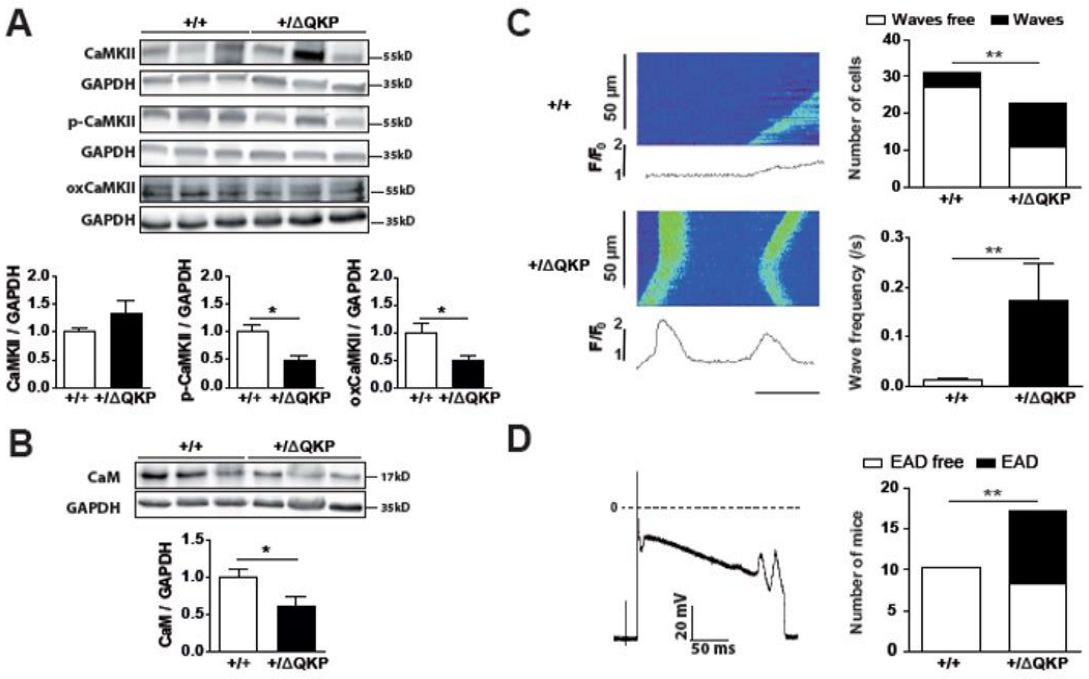

A
+/+
+/ΔQKP
CaMKII
GAPDH
p-CaMKII
GAPDH
oxCaMKII
GAPDH
55kD
35kD
55kD
35kD
55kD
35kD
CaMKII / GAPDH
p-CaMKII / GAPDH
oxCaMKII / GAPDH
B
CaM
GAPDH
17kD
35kD
CaM / GAPDH
C
+/+
+/ΔQKP
50 µm
F/F0
Waves free
Waves
Number of cells
Wave frequency (/s)
D
EAD free
EAD
Number of mice
0
20 mV
50 ms

Figure 6

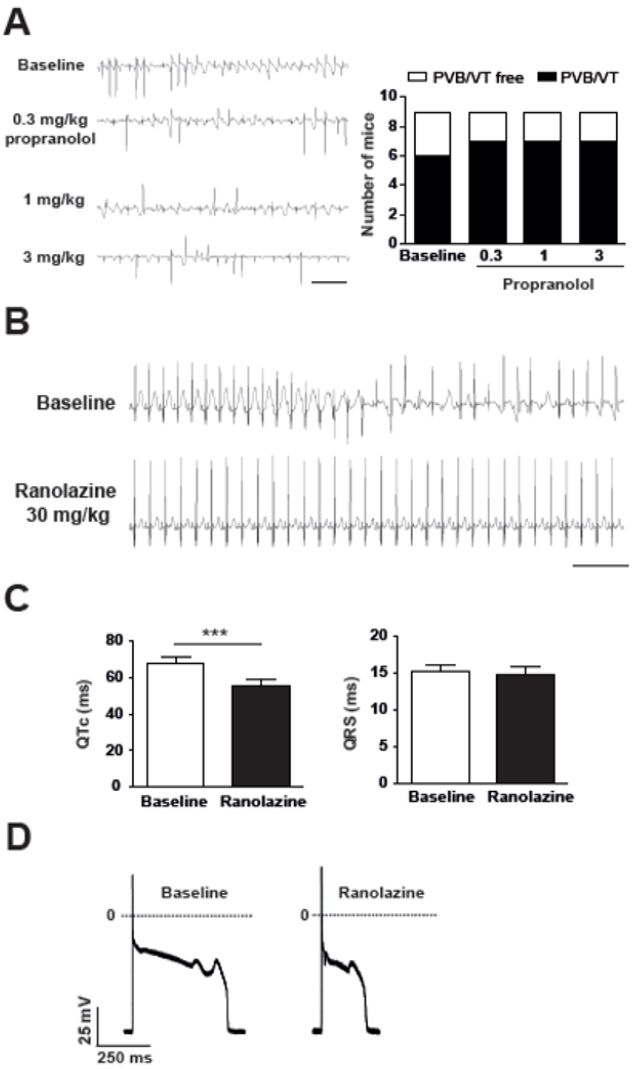

A
Baseline
0.3 mg/kg propranolol
1 mg/kg
3 mg/kg
PVB/VT free
PVB/VT
Number of mice
Baseline
0.3
1
3
Propranolol
B
Baseline
Ranolazine 30 mg/kg
C
***
QTc (ms)
Baseline
Ranolazine
QRS (ms)
Baseline
Ranolazine
D
Baseline
Ranolazine
25 mV
250 ms

Figure 7

HIV-Tat induces a decrease in I_{Kr} and I_{Ks} *via* reduction in phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate availability

Zeineb Es-Salah-Lamoureux[a]*, Mariam Jouni[a]*, Olfat A. Malak[a]*, Nadjet Belbachir[a], Zeina Reda Al Sayed[a], Marine Gandon-Renard[a], Guillaume Lamirault[a-b], Chantal Gauthier[a], Isabelle Baró[a], Flavien Charpentier[a-b], Kazem Zibara[c], Patricia Lemarchand[a-b], Bruno Beaumelle[d], Nathalie Gaborit[a§], Gildas Loussouarn[a§].

a. l'institut du thorax, Inserm, CNRS, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France
b. CHU de Nantes, Nantes, France
c. ER045, PRASE, Laboratory of stem cells, Lebanese university, Beirut, Lebanon
d. Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

,§. These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to:
Dr. Nathalie Gaborit
L'institut du thorax
INSERM UMR 1087 / CNRS UMR 6291
IRS-UN, 8 Quai Moncousu BP 70721
44007 Nantes cedex 1, France
Tel: +33 (0)2 2808 0132
Fax: +33 (0)2 2808 0130
E-mail: nathalie.gaborit@univ-nantes.fr

ABSTRACT

Patients with HIV present with a higher prevalence of QT prolongation, of which molecular bases are still not clear. Among HIV proteins, Tat serves as a transactivator that stimulates viral genes expression and is required for efficient HIV replication. Tat is actively secreted into the blood by infected T-cells and affects organs such as the heart. Tat has been shown to alter cardiac repolarization in animal models but how this is mediated and whether this is also the case in human cells is unknown. In the present study, we show that Tat transfection in heterologous expression systems led to a decrease in hERG (underlying cardiac I_{Kr}) and human KCNE1-KCNQ1 (underlying cardiac I_{Ks}) currents and to an acceleration of their deactivation. This is consistent with a decrease in available phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP_2). A mutant Tat, unable to bind PIP_2, did not reproduce the observed effects. In addition, WT-Tat had no effect on a mutant KCNQ1 which is PIP_2-insensitive, further confirming the hypothesis. Wild-type Tat incubation for 24 hours of human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes reduced I_{Kr} and accelerated its deactivation. Concordantly, this Tat incubation led to a prolongation of the action potential (AP) duration. Events of AP alternans were also recorded in the presence of Tat, and were exacerbated at a low pacing cycle length. Altogether, these data obtained on human K^+ channels both in heterologous expression systems and in human cardiomyocytes strongly suggest that Tat sequesters PIP_2, leading to a reduction of I_{Kr} and I_{Ks}, and provide a molecular mechanism for QT prolongation in HIV-infected patients.

Key words:

I_{Kr}; I_{Ks}; phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate; HIV-Tat protein; induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes; long QT syndrome

1. INTRODUCTION

As a consequence of the development of antiretroviral therapies (ART), life expectancy of HIV-positive individuals has greatly increased. For this population, excess mortality is moderate in industrialized countries and comparable with populations having other chronic conditions [1]. Life expectancy of HIV-positive individuals has also increased in middle income countries, gaining for instance 10 years between 2004 and 2011 in South Africa [2]. Worldwide, the increasing access of patients to ART, from 31% in 2008 to 36% in 2014 [3, 4] leads to further increase in aging HIV-positive individuals. This aging population faces additional pathologies that are over-represented as compared to the general population. This is pointed out by a study on sudden cardiac death (SCD) in HIV positive individuals, showing a mean SCD rate 4.5 fold higher than in the general population [5]. Furthermore, up to 20% of the HIV patients are presenting with a long QT syndrome (LQTS), a greater prevalence than in the general population; prolonged QT interval is a risk factor for malignant arrhythmia [5-8]. However, the mechanistic link between LQTS and HIV remains unidentified.

Many drugs and combinations of drugs may be potential triggers of LQTS through inhibition of a major cardiac repolarizing current, I_{Kr}, conducted by the voltage-gated potassium channel hERG [9]. Among them, numerous drugs currently prescribed to HIV-positive individuals have been associated with a QT prolongation, such as macrolides, pentamidine, azole antifungals, fluoroquinolones [10] and methadone [11]. On the other hand, QT prolongation on ECGs of HIV-positive individuals is correlated to the duration of HIV infection rather than the anti-HIV treatment [12]. Moreover, QT prolongation is observed in HIV-positive individuals under no medication recognized to prolong QT [13], suggesting a role for the virus itself in inducing LQTS. In addition, several studies using animal models suggest a rather direct implication of HIV in LQTS. For instance, prolonged cardiac repolarization and decreased repolarizing potassium currents were observed in mice expressing the whole HIV-1 genome [14, 15].

Among the ~15 proteins encoded by the virus, Tat appears as a potential candidate for inducing ventricular arrhythmias, as it prolongs the action potential of guinea-pig ventricular cardiomyocytes through a reduction in the hERG-related current, I_{Kr} [16]. Noteworthy, serum levels of Tat remain high in treated patients, which could explain the high prevalence in prolonged QT interval despite antiretroviral therapies [12, 17]. Among the documented roles of Tat in cells, it was shown that its affinity for phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP_2) is very high, the dissociation constant (K_d) being in the low nanomolar range [18]. QT

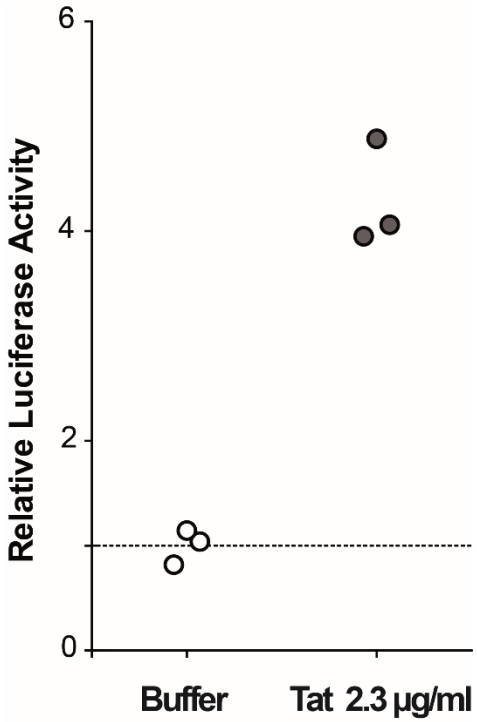
prolongation is majorly associated with the inhibition of two major cardiac delayed rectifier potassium currents: I_{Ks} and I_{Kr}, respectively carried by KCNQ1 channels associated with the regulatory subunit KCNE1 and hERG channels [19]. Interestingly enough, both KCNQ1 and hERG are positively regulated by PIP_2 [20, 21]. We thus hypothesized that Tat inhibits these channels by sequestering membrane PIP_2, leading to long QT syndrome in HIV patients.

In order to test this hypothesis, we evaluated the effect of Tat on cells expressing KCNQ1 or hERG channels. Tat over-expression led to a decrease in hERG and KCNE1-KCNQ1 currents and modification of their biophysical parameters, in particular an acceleration of deactivation. A mutant Tat with a profound decrease in PIP_2 affinity has no effect on these current and WT-Tat has no effect on a PIP_2 insensitive mutant KCNQ1 channel, consistent with Tat acting through a reduction in available PIP_2. In human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells, 24-h Tat incubation led to a decrease in cardiac I_{Kr} and acceleration of its deactivation, and these effects were associated with a prolongation of the action potential duration. Altogether, these observations suggest that in HIV-positive individuals, Tat sequesters PIP_2, leading to a decrease in I_{Kr} and I_{Ks} currents, providing a basis for QT prolongation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Tat protein preparation

Recombinant Tat was purified from *Escherichia coli* as previously described [22], resuspended as a 200 µg/ml stock solution in citrate buffer (110 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate, 20 mM sodium phosphate, pH 7.3), and stored at -80°C. BCA protein assay (Pierce) was used to measure Tat protein concentration. Tat transactivation activity was confirmed as previously described [23]. Briefly, COS-7 cells were cultured in 24-well plates and cotransfected using FuGENE 6 (Promega) with 0.22 µg/well pGL3-LTR, encoding firefly luciferase under the control of Tat-activated HIV-1-LTR promoter, and 1.78 µg/well pRL-TK (Promega), encoding Renilla luciferase under the control of Herpes simplex virus thymidine kinase promoter, to normalize the results. After 24 h, 2.3 µg/ml recombinant Tat and 100 µM chloroquine were added. One day later, cells were lysed for determination of dual firefly/Renilla luciferase activity ratio (Supplemental figure 1). Twenty-four hours before patch-clamp measurements and immunofluorescence assays, Tat was diluted and cells were incubated at concentrations of 200 ng/ml (~20 nM) or 400 ng/ml (~40 nM), consistent with patient serum levels [17].



Supplemental figure 1: Tat protein is active in COS-7 cells. Firefly/Renilla luciferase activity ratio in luciferase-transfected COS-7 cells, either untreated (Buffer) or incubated with WT-Tat (Tat). Firefly luciferase expression is driven by a Tat-dependent promoter while Renilla luciferase expression is insensitive to the presence of Tat and serves as an internal control.

2.2. Cell culture and transfection

HEK293 cells stably expressing hERG (HEK-hERG; CreaCell; protein accession number: NP_000229.1) and COS-7 cells (American Type Culture Collection) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Gibco) at 5% CO_2 and 37°C in a humidified incubator. For HEK-hERG cells, hERG expression was maintained by the application of the selection antibiotic G418 (1200 µg/ml; Life Technologies).

When reaching 60–80% cell confluence, COS-7 cells were transiently transfected in 35-mm plates with 2 µg of total DNA (as described below) complexed with FuGENE 6. For Tat and KCNE1-KCNQ1 co-transfection experiments, the ionic currents were obtained from a fusion protein of the human KCNE1 (protein accession number: AAA58418.1) linked to the N-terminus of the human KCNQ1 (protein accession number: NP_000209.2), a kind gift of Dr Robert S. Kass (Columbia University, New York, USA). DNA amounts were 200 ng of pCDNA3.1-WT-KCNE1-KCNQ1 [21] or pCDNA3.1-KCNE1-R539W-KCNQ1 + 1.6 µg of bidirectional pBI-WT-Tat or pBI-W11Y-Tat or pEGFP-C1 (Clontech) + 200 ng of pUHD-15.1 (required for expression from pBI vector [18]). For Tat and hERG co-transfection experiments, DNA amounts were 600 ng of pSI-hERG (protein accession number: NP_000229.1) [21] + 1.2 µg of pBI-WT-Tat/GFP or pBI-W11Y-Tat/GFP bidirectional plasmid, or pEGFP-C1 (Clontech) + 200 ng of pUHD-15.1. For Tat incubation experiments, DNA amounts were 600 ng of pSI-hERG + 1.4 µg of pEGFP-C1 (Clontech) or 200 ng of pCDNA3.1-KCNE1-KCNQ1 + 1.8 µg of pEGFP-C1 (Clontech). Cells were isolated, using trypsin, 24 h after transfection (of ion channels cDNA) for Tat incubation experiments or 48 h after transfection for Tat transfection experiments, and cultured in 35mm plastic Petri dishes. In the latter case, medium was renewed 8 h before cells were split. For Tat incubation experiments, Tat or citrate buffer diluted in culture medium were applied 4-6 hours after cells splitting and treated cells were incubated at 37°C. Experiments were performed the day after cell splitting.

2.3. Culture of human induced pluripotent stem cells

The previously characterized foreskin fibroblast-derived human induced pluripotent stem (hiPS) cell clone C2a was used [24]. The hiPS cell line was maintained on mitotically-inactivated MEFs in DMEM/F12 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.07% β-mercaptoethanol, 20% knockout serum replacement, 5 ng/ml bFGF and 1% NEAA under low oxygen atmosphere (4% O_2). Cells were passaged by manual dissection of cell clusters every 6

to 7 days. Before cardiac differentiation, hiPS cells were manually transferred from MEFs to hESC-qualified matrigel-coated plates (0.05 mg/ml, BD Biosciences) and cultured in StemMACS (iPS-Brew XF) medium (Miltenyi Biotec). Passages were performed using Gentle Cell Dissociation Buffer (StemCell Technologies).

2.4. Differentiation of hiPS cells into cardiomyocytes and dissociation

Human iPS cells were differentiated into cardiomyocytes using the Matrix sandwich method, as previously described [25, 26]. Cardiomyocytes derived from hiPS cells (hiPS-CMs) were dissociated around day 20 of differentiation, for 20 min in collagenase II (200 U/ml; Gibco) at 37°C. Isolated cells were then incubated at room temperature for 30 min in Kraft-Bruhe solution containing (in mmol/L): KCl 85, K_2HPO_4 30, $MgSO_4$ 5, EGTA 1, Na_2-ATP 2, Na-pyruvate 5, creatine 5, taurine 20, and glucose 20, pH 7.2 [27]. For Tat immunofluorescence studies, dissociated hiPS-CMs were plated on IBIDI plates (Biovalley). Beating hiPS-CMs were cultured in RPMI1640 medium supplemented with B27 complete (Life Technologies) and 1% NEAA and changed every other day and used between day 10 and day 14 post-dissociation.

2.5. Single-cell electrophysiology in COS-7 and HEK-hERG cells

In HEK-hERG and transfected COS-7 cells, currents were recorded at room temperature using the patch-clamp technique. The cells were continuously superfused with a HEPES buffered Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 145, KCl 4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH. For K^+ current recordings, pipettes (Kimble Chase; tip resistance: 1.8 to 2.5 MΩ) were filled with an intracellular medium containing (in mmol/L): KCl 100, Kgluconate 45, $MgCl_2$ 1, EGTA 5, HEPES 10, pH adjusted to 7.2 with KOH. All products were purchased from Sigma. Stimulation and data recording were performed with Axon pClamp 10 through an A/D converter (Digidata 1440A) using an Axopatch 200B (all Molecular Devices). hERG current (I_{hERG}) density was measured using a depolarization from -80 mV to +60 mV for 2 s and repolarization to -40 mV for 2 s where the tail current was measured (stimulation frequency: 0.125 Hz). Activation curve was obtained by a series of 2-s depolarizations from -70 to +60 mV (same holding potential and frequency as above, increment: 10 mV) followed by a 2-s repolarization to -40 mV. Inactivation was studied with a three-pulse protocol: a 1-s depolarization from -80 mV to +40 mV was followed by a 15-ms repolarization to potentials ranging from +30 to -130 mV and a 500-ms depolarization to +40 mV where the remaining current was measured (0.2 Hz). Kinetics of deactivation were evaluated by a two-exponential regression of the decaying current recorded at various potentials from -70 to -130

mV (3-s duration), after a 2-s depolarization from -80 mV to +40 mV (0.125 Hz). The same protocol was used to evaluate the recovery from inactivation kinetics by fitting the rising phase of the current, before deactivation, with a single exponential function. Finally, inactivation kinetics were studied with another three-pulse protocol: a 1-s depolarization from -80 mV to +60 mV was followed by a 25-ms repolarization to -110 mV and 500-ms-depolarizations to potentials ranging from +60 to -60 mV where the inactivating current was fitted with a single exponential function (0.2 Hz). KCNE1-KCNQ1 current density was measured using depolarizations from a holding potential of -80 mV to various potentials from -70 mV to +80 mV for 4 s (or from -60 mV to +120 mV when comparing WT-Tat effect on WT KCNE1-KCNQ1 and KCNE1-R539W-KCNQ1) and repolarization to -40 mV for 1.2 s where the tail current was measured (increment: 10 mV, stimulation frequency: 0.125 Hz). Fit of the non-normalized activation curves was used to estimate full-activated KCNE1-KCNQ1 current density for each cell.

2.6. Action potential, I_{Kr}, and $I_{Ca,L}$ recordings in cardiomyocytes derived from hiPS cells

Before recording, cells were incubated for 24 h either with citrate buffer or with 200 ng/ml (20 nmol/L) of Tat protein. Cells were continuously superfused with a cardiomyocyte Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 140, KCl 4, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 0.5, glucose 10, HEPES 10; pH 7.4 (NaOH) at 35 ± 2°C as previously described [26].

For action potential (AP) recording the permeabilized-patch configuration was used. The pipette (Sutter; tip resistance: 2 to 3 MΩ) solution contained (in mmol/L): K-gluconate 125, KCl 20, NaCl 5, amphotericin B $0.85x10^{-3}$, HEPES 5; pH 7.2 (KOH). APs were recorded at spontaneous rate or stimulated by 1.3-1.5 ms current pulses of 300-1500 pA at various pacing cycle lengths. APs were classified as nodal-, atrial- and ventricular-like, based on their duration, maximum upstroke velocity (dV/dt_{max}), peak to peak duration, amplitude (mV) and maximum diastolic potential, as previously defined [26].

For currents recording, the ruptured-patch configuration was used.

For I_{Kr} recording, the pipette was filled with a solution containing (in mmol/L): K-gluconate 125, KCl 20, HEPES 10, EGTA 10; pH 7.2 (KOH). A local gravity microperfusion system allowed application of 4 µmol/L nifedipine to block $I_{Ca,L}$ and 1 µmol/L E-4031 to block I_{Kr} [28], dissolved in cardiomyocyte Tyrode solution plus mannitol 30 mmol/L.

I_{Kr} tail current density was measured as the E-4031-sensitive current using a depolarization from -50 mV to +60 mV for 4 s and repolarization to -50 mV where the tail current was

measured (stimulation frequency: 0.08 Hz). Activation was evaluated by a series of 4-s depolarizations from -60 to +20 mV (holding potential: -50 mV, increment: 10 mV, same frequency as above) followed by a repolarization to -50 mV. Deactivating currents were fitted by a standard bi-exponential function.

$I_{Ca,L}$ was recorded at room temperature. Wax-coated pipettes were filled with an intracellular medium containing (in mmol/L): $CsCl_2$ 145, NaCl 5, $CaCl_2$ 2, MgATP 5, EGTA 5, HEPES 10, pH adjusted to 7.2 with CsOH. During recording, the microperfusion system allowed application of an extracellular solution containing (in mmol/L): TEA-Cl 160, $CaCl_2$ 5, $MgCl_2$ 1, glucose 10, HEPES 10, TTX 0.01, mannitol 20; pH 7.4 (CsOH).

$I_{Ca,L}$ I/V curve was evaluated by a series of 200-ms depolarizations from a 3-s pre-pulse to -50 mV to potentials ranging from -60 to +50 mV (increment: 5 mV, stimulation frequency: 0.125 Hz) followed by a repolarization to the holding potential at -80 mV. Inactivation was studied with a two-pulse protocol: a 3-s depolarization to potentials ranging from -80 to +20 mV was followed by a 400-ms depolarization to 0 mV where the peak current was measured (holding potential: -50 mV, 0.125 Hz).

2.7.I_{KATP} recordings in mouse neonatal cardiomyocytes

Single cell suspensions from 1-2 day-old mouse neonatal hearts were prepared in a semi-automated procedure by using the Neonatal Heart Dissociation kit and the gentleMACS™ Dissociator. Hearts were first excised from the mice then the ventricles were separated from the atrium. After gentleMACS™ dissociation, the cell supernatant was removed by centrifugation and the pellet was resuspended in culture medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum and penicillin (100U/mL)/ streptomycin (100 µg/mL), then the cells were plated on 65 mm diameter Petri dish (Nunc™). After 2h of initial plating, myocytes were resuspended in the same culture medium and plated on 35 mm diameter Petri dishes at a density of 6 x 10^4 cells per plate. Myocytes were maintained in culture for 48 hours.

Cells were continuously superfused with a cardiomyocyte Tyrode solution, as above, at 35 ± 2°C. The pipette was filled with a solution containing (in mmol/L): K-aspartate 85, KCl 44, Na-pyruvate 5, HEPES 10, EGTA 0.01; $MgCl_2$ 3; pH 7.2 (KOH). During recording, a local gravity microperfusion system allowed application of 20 µmol/l glibenclamide [28], dissolved in an extracellular solution containing (in mmol/L): NaCl 140, KCl 4, $CoCl_2$ 1, $MgCl_2$ 0.5, mannitol 30, HEPES 10; pH 7.4 (NaOH). From a holding potential of -70 mV, followed by a

20-ms step to -20mV, current was measured at the end of a 350 ms pulse to +40 mV (0.2 Hz). After patch rupture, the outward current increased gradually due to dilution of cytosolic ATP into the pipette. When the current reached steady state, glibenclamide was added to the external solution to block the I_{KATP} current. A ramp protocol was used to monitor the current decrease upon glibenclamide application. From a holding potential of -70 mV, a 20 ms step to -110 mV was applied followed by a 500 ms ramp from -110 to +40 mV (stimulation frequency, 0.2 Hz). A step protocol was applied before and after glibenclamide application to measure the glibenclamide-sensitive current.

2.8. Tat immunofluorescence

Two types of histological analyses were performed, (1) one to study localization of transfected Tat in COS-7 cells, (2) another to study localization of incubated Tat in both COS-7 and hiPS-CMs. (1) COS-7 cells were transfected with hERG and either WT- or W11Y-Tat/GFP bidirectional plasmids as for patch-clamp experiments. Forty eight hours after transfection, cells were plated on IBIDI plates for 24h. (2) COS-7 cells were transfected with hERG plasmid only, and forty eight hours after transfection, cells were plated on IBIDI plates. Both COS-7 cells and dissociated hiPS-CMs were then incubated with Tat protein at 200ng/ml for 24h.

Cells were fixed with 3.7% formaldehyde, permeabilized with 0.5% saponin and blocked with 1% PBS-BSA. All cells were then stained with mouse monoclonal antibody directed against HIV-1 Tat (SC-65912, Santa Cruz) and cells incubated with Tat were co-stained with goat polyclonal antibody directed against hERG (SC-15968, Santa Cruz) diluted in PBS. For all immunostainings, secondary antibody staining was performed using respectively Alexa 568 conjugated anti-mouse antibody and Alexa 488 conjugated anti-goat antibody (Molecular Probes). DAPI was used for nuclear staining. For Tat-transfected COS-7 cells, GFP was directly observed. Conventional imaging was performed using Nikon Confocal A1RSi and Super-resolution imaging using with N-SIM (Structured Illumination Microscopy) microscope system (Nikon) equipped with a SR Apo 100 × 1.49 N.A.

2.9. mRNA and Protein expression analysis

For gene expression analysis, total RNA was extracted and reverse transcribed, from hiPS-CMs and HEK-hERG cells, as previously described [26]. PCR amplification was performed using FAM-labeled TaqMan probes: ACTB (Hs99999903_m1), KCNH2 (Hs04234270-g1) and Troponin I (Hs00165957-m1).

For Western blot analysis, 60 µg of protein lysate from hiPS-CMs or 10 µg of protein lysate from HEK-hERG, both treated for 24 h with 200 ng/ml Tat or buffer were incubated with mouse antisera against hERG protein (Santa Cruz). Secondary antibody staining was performed using goat anti-mouse IgG-HRP antibody (Santa Cruz). Stain Free gel technology (Bio-Rad) was used as loading control for protein normalization: the amount of total proteins in each lane of the blot was calculated and used for normalization [29, 30].

2.10. Data analysis

Steady-state activation and inactivation curves were fitted with a single Boltzmann function using GraphPad Prism 5.02. Data are presented as mean ± SEM when normally distributed or Tukey boxplots (Q1-Q3 boxes) when not. Statistical significance was estimated using Student's t-test, Mann-Whitney test, or two-way ANOVA for repeated measures when appropriate. Post-hoc test for multiple comparison (Holm-Sidak method) was performed when needed. A value of $p < 0.05$ was considered as the threshold for statistical significance.

3. RESULTS

3.1. Tat transfection leads to a decrease in hERG and KCNE1-KCNQ1 currents and acceleration of deactivation, consistent with a decrease in PIP_2 availability

We first evaluated the effects of Tat co-expression with hERG or KCNQ1 fused to KCNE1 (KCNE1-KCNQ1) in COS-7 cells. This set of experiments allowed us to compare the effects of WT-Tat with those of W11Y-Tat, which presents a profoundly reduced PIP_2 affinity, although having a normal transactivation activity [18]. In contrast with WT-Tat, this mutant cannot enter the cells and thus, testing the effects of its intracellular application requires its transfection. Figure 1A shows representative hERG current recordings in cells co-transfected with GFP, WT-Tat, or W11Y-Tat. I_{hERG} density was reduced in presence of WT-Tat as compared to GFP. In order to test whether this is due to a reduction in PIP_2 availability, we evaluated the effects of the W11Y-Tat. Consistent with the hypothesis, we did not observe any alteration of the hERG current. It was shown that a decrease in PIP_2 leads to a destabilization of hERG open state, provoking a reduction in the current amplitude and an acceleration in channel deactivation without any shift of the activation curve to positive potentials [21]. In accordance with a PIP_2-reduction effect, WT-Tat and not W11Y-Tat led to the same changes in current density and deactivation without any shift in the activation curve (Figure 1B-D, Table 1). These data suggest that Tat inhibits hERG by sequestering PIP_2.

For KCNE1-KCNQ1 also, a decrease in PIP_2 availability leads to a decrease in current density and an acceleration of deactivation [20]. Again, WT-Tat but not W11Y-Tat led to the same effects as when the channel interaction with PIP_2 is altered (Figure 1E-H, Table 1). To confirm the hypothesis that Tat reduces the current amplitude of delayed rectifier currents through a decrease in available PIP_2, we tested the effect of Tat on the mutant KCNE1-R539W-KCNQ1 channel that is insensitive to PIP_2 depletion, when triggered by wortmannin application or by CiVSP phosphatase activation [31]. We compared current amplitude in cells expressing KCNE1-R539W-KCNQ1 in the absence and presence of Tat (Figure 2). As opposed to WT KCNE1-KCNQ1, Tat expression did not affect KCNE1-R539W-KCNQ1 current amplitude measured after channel full activation, reinforcing the interpretation that Tat decreases KCNE1-KCNQ1 channel activity through a decrease in available PIP_2.

Altogether, these data strongly suggest that Tat inhibits hERG and KCNE1-KCNQ1 currents by sequestering PIP_2.

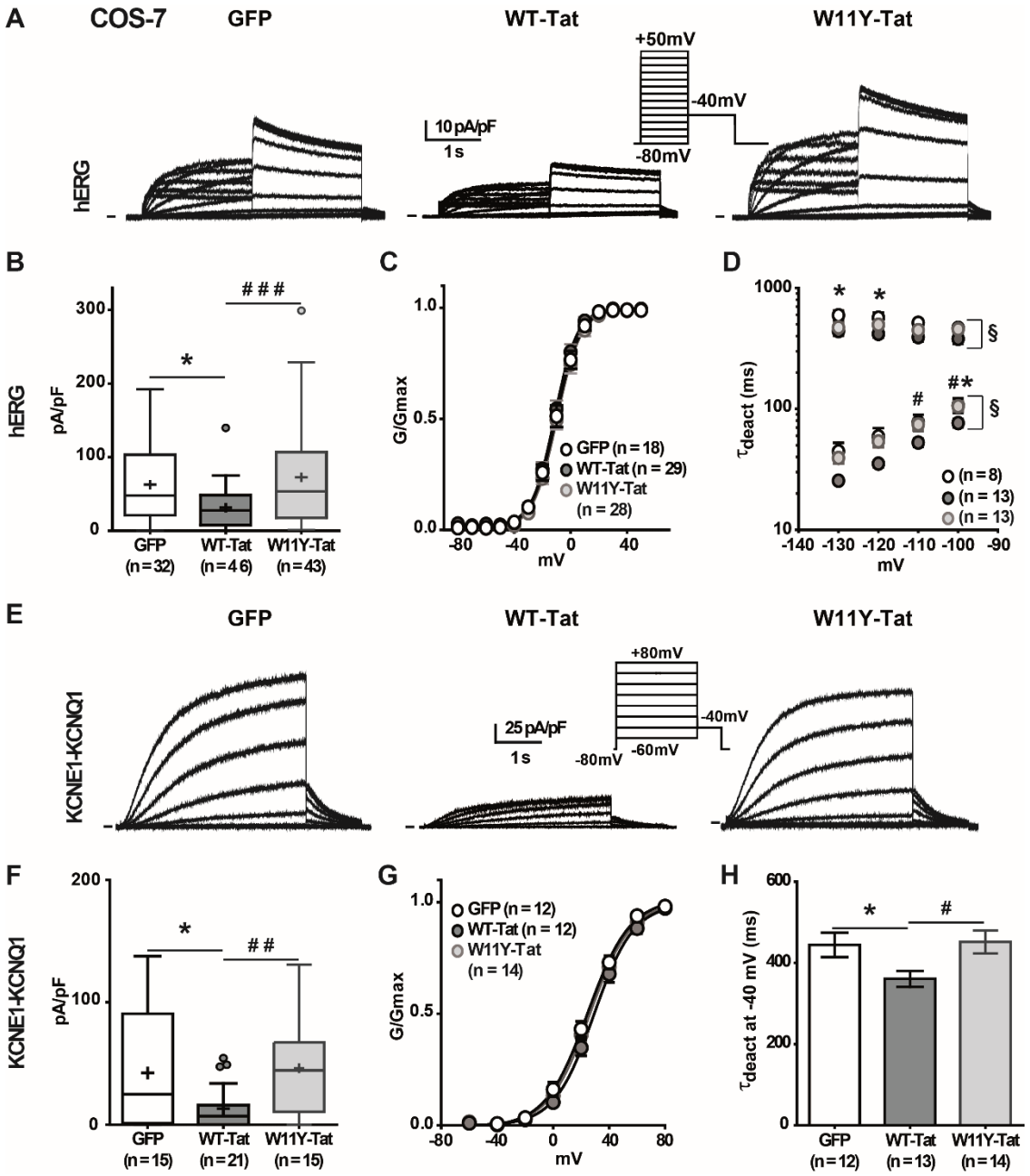


Figure 1: Tat transfection alters hERG and KCNE1-KCNQ1 currents in COS-7 cells. (A) Representative superimposed current recordings in COS-7 cells co-transfected with hERG, and either GFP, WT-Tat/GFP or W11Y-Tat/GFP, a mutant with reduced PIP_2 affinity. (B) Tukey boxplots presenting hERG maximal tail current densities; (C) activation curves and (D) time constants of deactivation (fast and slow) *versus* voltage in the same conditions as in A. The fast component represents 80 to 90% of the deactivating current, depending on the potential, with no effect of Tat. (E) Representative current recordings in COS-7 cells co-transfected with KCNE1-KCNQ1, and either GFP, WT-Tat/GFP or W11Y-Tat/GFP. (F) Tukey boxplots presenting KCNE1-KCNQ1 maximal tail current densities; (G) activation curve and (H) time constants of deactivation at -40 mV in the same conditions as in E. Current densities differences were statistically evaluated using a Mann-Whitney test, hERG τ_{deact} using a two-way ANOVA for repeated measurements, and KCNE1-KCNQ1 τ_{deact} at -40 mV using Student t-test. * $p < 0.05$; for WT-Tat *vs* GFP. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ for W11Y-Tat *vs* WT-Tat. § $p < 0.05$.

Table 1: Tat transfection alters hERG and KCNE1-KCNQ1 currents in COS-7 cells: biophysical characteristics.

Tat transfected	COS-7 hERG			COS-7 KCNE1-KCNQ1		
	GFP	WT-Tat	W11Y-Tat	GFP	WT-Tat	W11Y-Tat
Current density	(32)	(46)	(43)	(15)	(21)	(15)
at 60 mV (pA/pF)	62.6 ± 9.5	31.2 ± 3.9*	72.6 ± 10.4###	42.2 ± 13.1	13.0 ± 3.9*	46 ± 10.3##
Activation	(18)	(29)	(28)	(12)	(12)	(14)
$V_{1/2}$ (mV)	-10.2 ± 1.7	-11.1 ± 1.5	-8.98 ± 1.6	24.6 ± 2.3	29.9 ± 2.3	26.6 ± 1.9
K (mV)	7.6 ± 0.3	6.8 ± 0.1**	7.1 ± 0.1	13.4 ± 0.7	13.5 ± 0.6	13.9± 0.4

(n): number of cells; Student t-test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs GFP; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$ vs WT-Tat; $V_{1/2}$ and K: voltage for half-activation or -inactivation of the K^+ currents and slope.

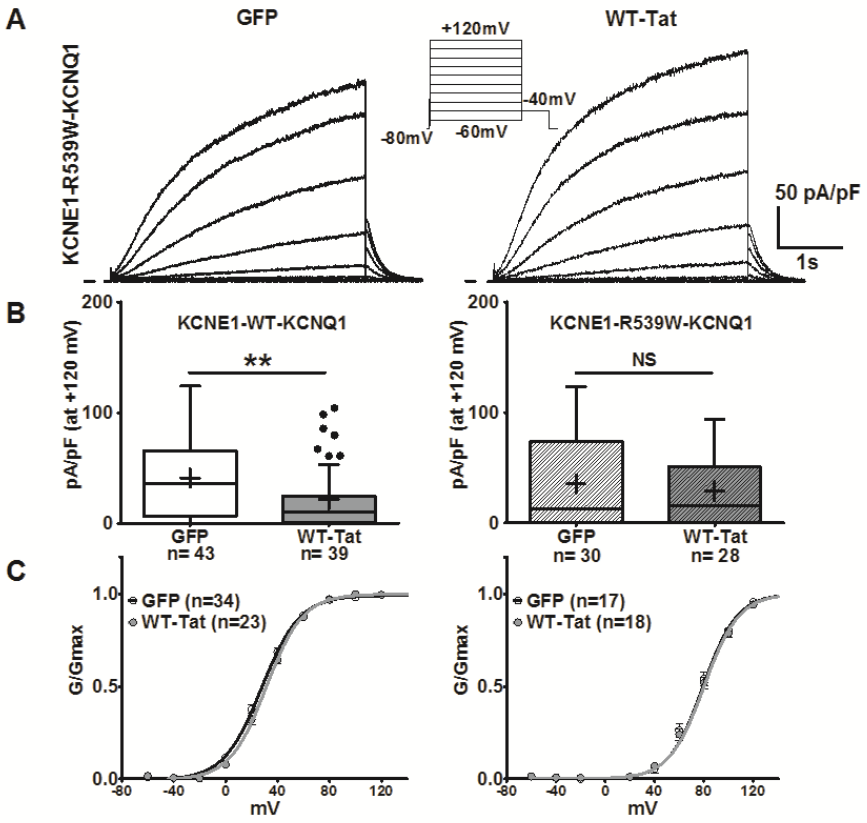


Figure 2: Tat transfection does not alter the PIP_2 insensitive mutant KCNE1-R539W-KCNQ1 currents in COS-7 cells. (A) Representative superimposed current recordings in COS-7 cells co-transfected with KCNE1-R539W-KCNQ1, and either GFP (left) or WT-Tat/GFP (right). (B) Tukey boxplots presenting WT-Tat effect on WT (left) or KCNE1-

R539W-KCNQ1 (right) maximal tail current densities, using the same stimulation protocol as in A (depolarization up to +120 mV); (C) activation curve in the same conditions as in A. Current densities differences were statistically evaluated using a Mann-Whitney test. ** p <0.01.

To localize Tat, immunofluorescence assays were performed using the same conditions as for patch-clamp experiments, *i.e.* cotransfection of hERG with either WT- or W11Y-Tat/GFP bidirectional plasmids. They confirmed that WT-Tat localizes at the COS-7 plasma membrane, through its interaction with PIP_2 [32]. Unlike WT-Tat, W11Y-Tat localized diffusely in the cytosol, its lack of affinity for PIP_2 preventing its plasma membrane localization (Figure 3A & B). This is consistent with the absence of W11Y-Tat effect on PIP_2-dependent channels activity.

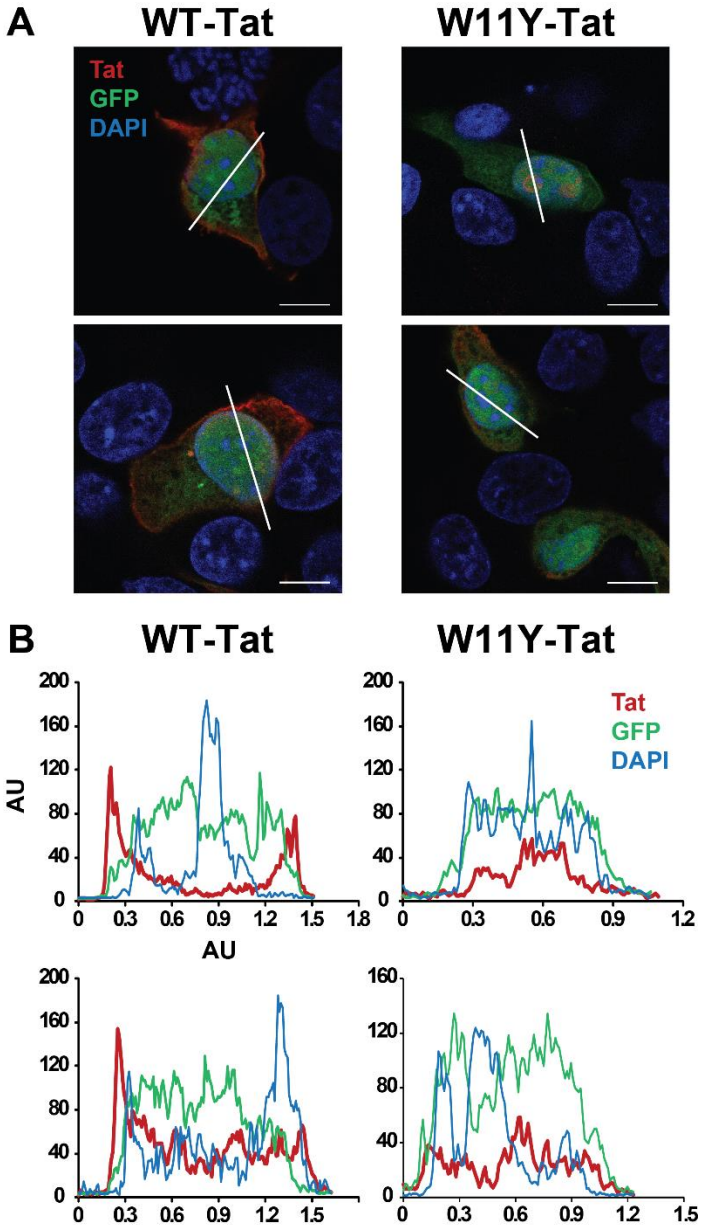


Figure 3: WT-Tat but not W11Y-Tat localizes at the plasma membrane in COS-7 cells. (A) Representative confocal immunostainings of, in red, WT-Tat or W11Y-Tat in transfected COS-7 cells. GFP is used as a transfection reporter. Nuclei are stained with DAPI. Scale = 10 µm. (B) Surface plots of Tat, GFP and DAPI fluorescence intensities in each cell at the level of the drawn lines in A. Higher WT-Tat densities are observed in the region of the plasma membrane, as opposed to W11Y-Tat.

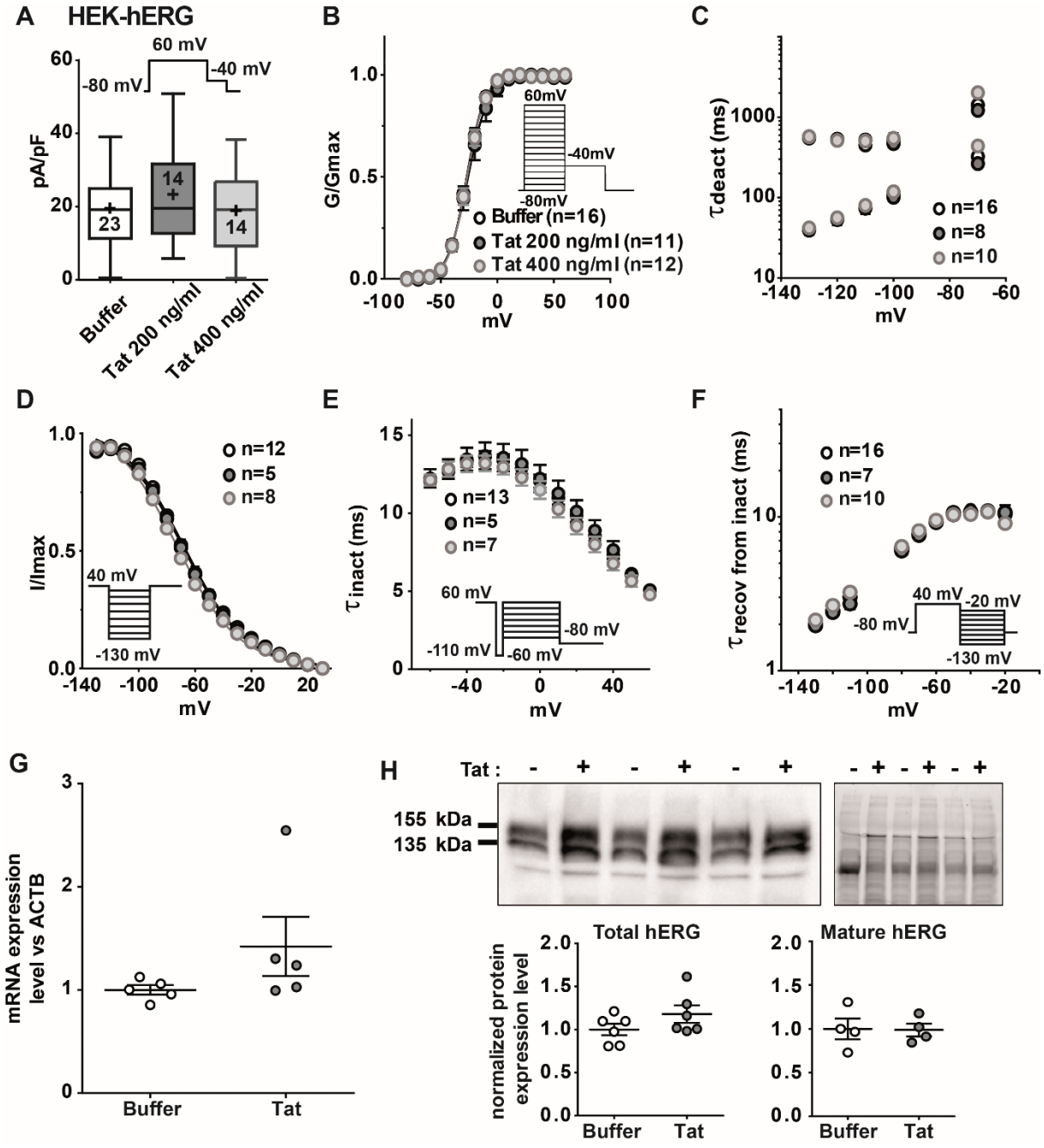
3.1. Tat incubation does not alter hERG and KCNE1-KCNQ1 currents in heterologous expression systems

In HIV patients, T-cells-secreted Tat can enter multiple cell types, through the interaction with various ubiquitous receptors [18]. We thus tested the effect of Tat applied externally on hERG and KCNE1-KCNQ1 channels activity. We first studied the effect of Tat 24-h incubation in HEK293 cells stably expressing hERG channels. We chose a 24-h incubation since in the different biological assays in which Tat had been tested (neurosecretion [32] and phagocytosis [33]), it was found to require some time (3-4 hours) for Tat, after initial internalization, to accumulate on PIP_2 and to perturb processes relying on this phosphoinositide. Moreover such a 24-h incubation, and not acute application, had already been associated with a decrease in hERG current density in this model [16]. Surprisingly and unlike the previous observations, Tat incubation (200 or 400 ng/ml) did not induce any change (Supplemental figure 2A; Supplemental table 1). In addition, neither activation nor inactivation curves were modified by Tat incubation (Supplemental figure 2B & D; Supplemental table 1), nor the kinetics of deactivation, inactivation and recovery from inactivation (Supplemental figure 2C, E & F). In addition, neither mRNA nor total hERG protein levels were affected (Supplemental figure 2G & H). Tat entry into cells occurs through receptors of which expression vary from one cell type to another [34]. The observed absence of Tat effect may then be due to insufficient penetration into HEK cells. In order to evaluate whether the cell type could explain the absence of incubated Tat effect on I_{hERG}, this analysis was repeated in COS-7 cells transiently expressing hERG (Supplemental figure 3). Again 200 ng/ml Tat incubation did not lead to any change in either hERG current density or biophysical parameters. In addition, we did not observe any effect of Tat incubation on KCNE1-KCNQ1 channel activity in COS-7 cells (Supplemental figure 4).

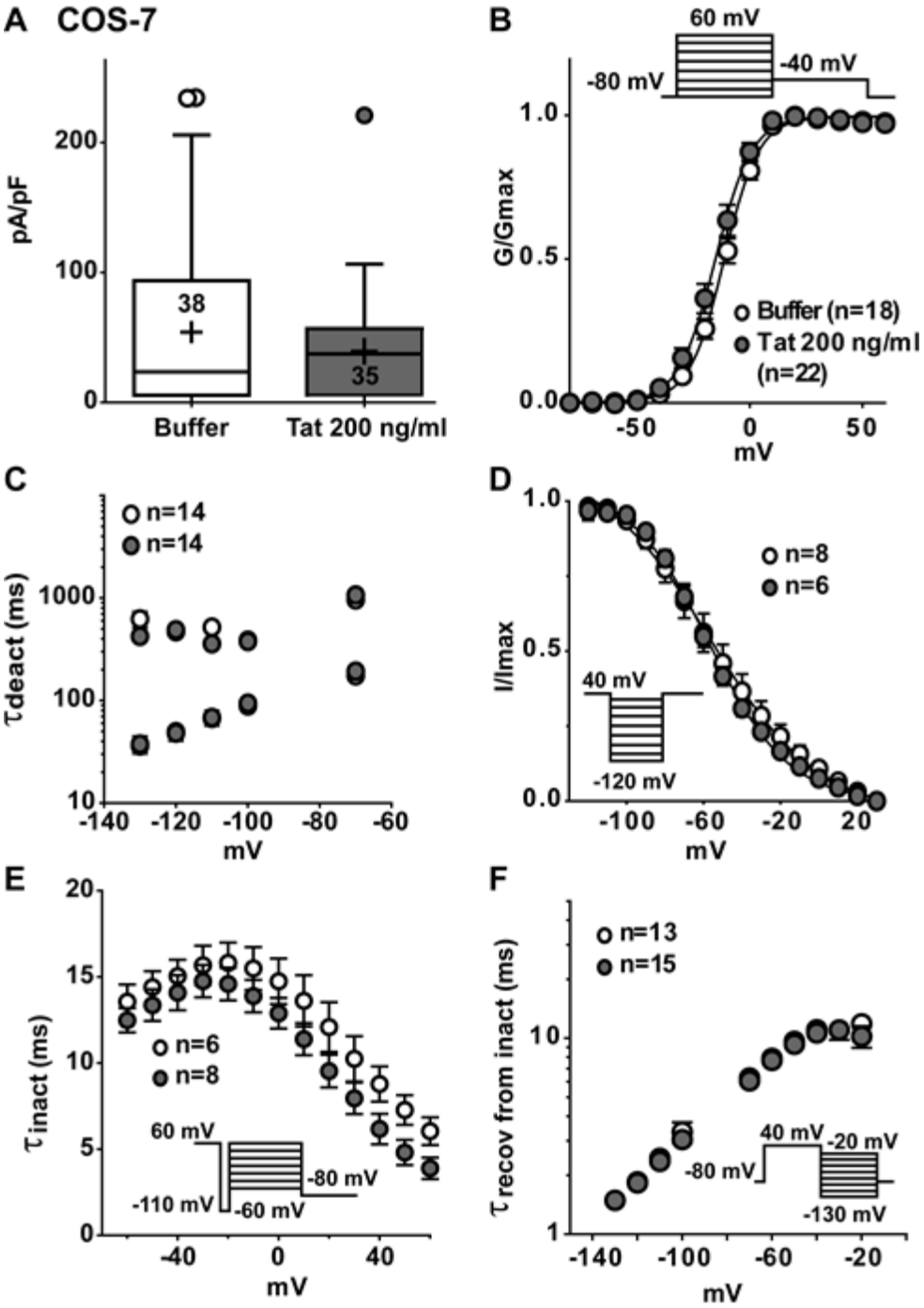
Supplemental table 1: Tat incubation has no effect on hERG and KCNE1-KCNQ1 currents in heterologous expression systems: biophysical characteristics.

Tat incubated	HEK-hERG			COS-7-hERG		COS-7-KCNE1-KCNQ1	
	Buffer	Tat 200 ng/ml	Tat 400 ng/ml	Buffer	Tat 200 ng/ml	Buffer	Tat 200 ng/ml
Current density	(23)	(14)	(14)	(38)	(35)	(19)	(19)
at 60 mV (pA/pF)	19.5 ± 2.0	23.3 ± 3.7	18.9 ± 2.9	54.6 ± 10.9	39.9 ± 7.3	31.7 ± 7.5	42.0 ± 8.6
Activation	(16)	(11)	(12)	(18)	(22)	(11)	(11)
$V_{1/2}$ (mV)	-26.9 ± 1.4	-25.0 ± 2.8	-26.6 ± 1.4	-11.1 ± 1.4	-15.1 ± 1.8	26.6 ± 4.6	26.7 ± 4.3
K (mV)	7.4 ± 0.2	7.6 ± 0.3	7.5 ± 0.1	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.2	16.6 ± 1.4	15.4 ± 0.6
Inactivation	(12)	(5)	(8)	(8)	(6)		
$V_{1/2}$ (mV)	-66.3 ± 1.4	-67.2 ± 3.2	-71.0 ± 2.1	-54.6 ± 7.3	-57.3 ± 2.4	-	-
K (mV)	20.7 ± 0.4	20.9 ± 0.5	20.3 ± 0.7	22.6 ± 0.6	20.4 ± 0.7	-	-

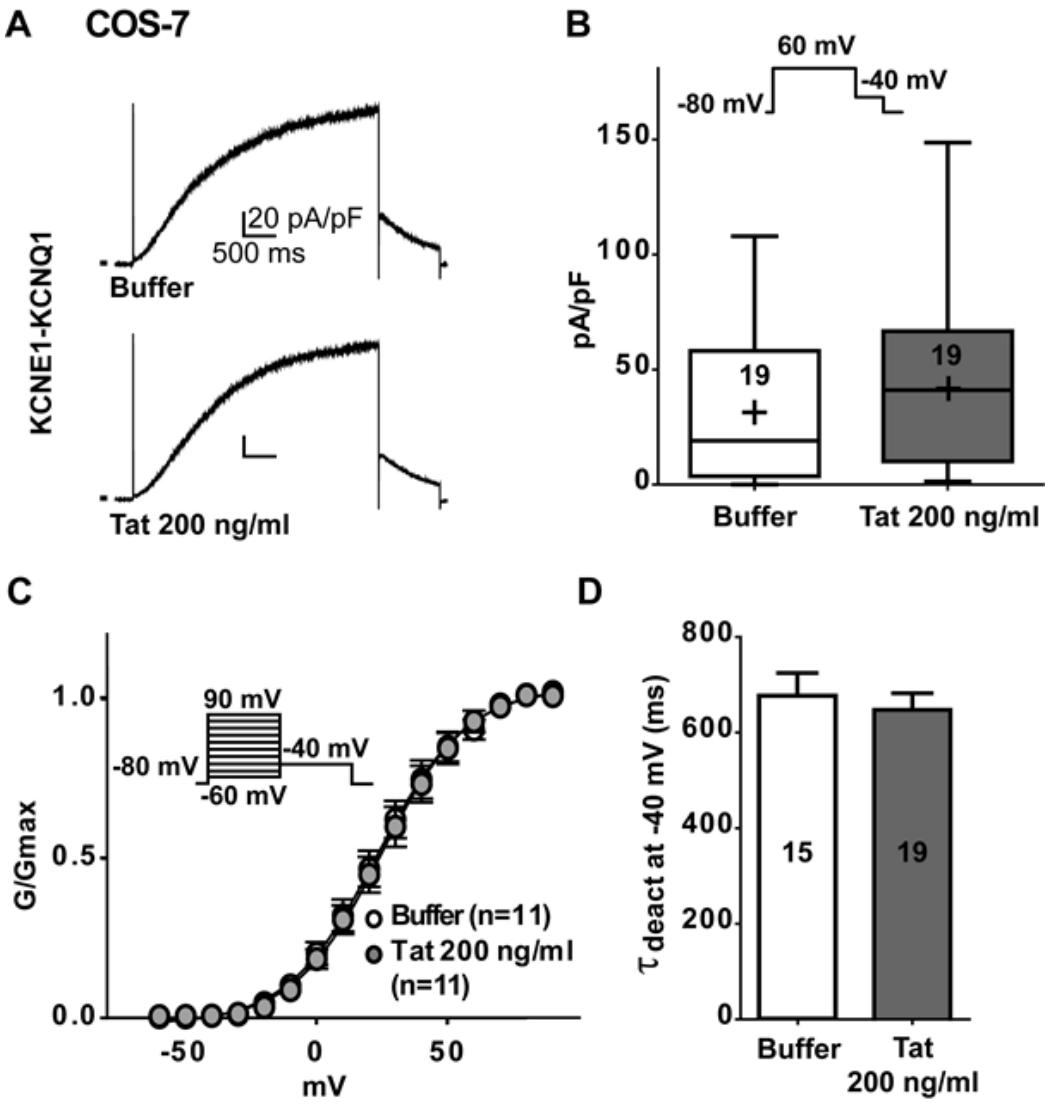
(n): number of cells; Student t-test. $V_{1/2}$ and K: voltage for half-activation or -inactivation of the K^+ currents and slope.



Supplemental figure 2: Tat incubation has no effect on hERG current in HEK-hERG cells. (A) Tukey boxplots presenting hERG tail current densities incubated with buffer, 200 ng/ml or 400 ng/ml WT-Tat (Tat). (B) Activation curve measured from the tail current densities; (C) time constants of deactivation (fast and slow) *versus* voltage; (D) inactivation curve; (E) time constants of inactivation *versus* voltage; (F) time constants of recovery from inactivation *versus* voltage in the same conditions as A. The protocols used are shown as insets. The same protocol is used for (C) and (F). (G) hERG mRNA expression level *versus* ACTB mRNA. (H) Top left: Western blot analysis of hERG protein expression in HEK-hERG cells. Two hERG specific bands were revealed (mature, glycosylated membrane subunit, 155 kDa, and immature, non-glycosylated cytoplasmic subunit, 135kDa). Top right: Stain-free expression served as internal control of gel loading. Bottom: Normalized intensity quantification of the total and mature hERG bands.



Supplemental figure 3: Tat incubation has no effect on hERG current in transfected COS-7 cells. (A) Tukey boxplots presenting hERG tail current densities recorded from cells incubated with buffer or 200 ng/ml WT-Tat (Tat). (B) Activation curves measured from the tail currents; (C) time constants of deactivation (fast and slow) *versus* voltage; (D) inactivation curves; (E) time constants of inactivation *versus* voltage; (F) time constants of recovery from inactivation *versus* voltage in the same conditions as A. The protocols used are shown as insets. The same protocol is used for (C) and (F).



Supplemental figure 4: Tat incubation has no effect on KCNE1-KCNQ1 current in transfected COS-7 cells. (A) Representative current recordings in COS-7 cells transfected with KCNE1-KCNQ1, and incubated with either buffer or 200 ng/ml WT-Tat (Tat; voltage protocol in B). (B) Tukey boxplots presenting KCNE1-KCNQ1 tail current densities; (C) activation curves and (D) time constants of deactivation at -40 mV in the same conditions as in A.

3.1.Tat incubation decreases I_{Kr} in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells

Cardiomyocytes differentiated from hiPS cells provided us with the opportunity to evaluate the effect of Tat incubation on a more relevant cellular model than non-cardiac cells. As shown in figure 4A & B, I_{Kr}, isolated as the E-4031-sensitive current, was significantly reduced in hiPS-CMs incubated for 24 h with 200 ng/ml Tat. After full activation, the maximum tail E-4031-sensitive current density measured at -50 mV was reduced by 31% (Figure 4B; Table 2; $p < 0.05$). In addition, no detectable I_{Ks} was observed after E-4031-application. Thus, activation

curve and deactivation kinetics were measured using the total K^+ tail current. The activation curve was not modified but the current deactivation was accelerated (Figure 4C & D; Table 2, $p < 0.05$). Therefore, we observed similar effect of Tat on the activation gate as compared to the experiments in Tat-transfected COS-7 cells, reminiscent of the effect of a decrease in PIP_2. This suggests that hiPS-CMs express receptors allowing Tat integration in sufficient quantity to alter the currents, as opposed to COS-7 and HEK293 cellular models. We directly tested this hypothesis using confocal and Structured Illumination Microscopy (SIM) imaging on Tat-incubated COS-7 cells expressing hERG, and on hiPS-CMs. Confocal images showed that Tat protein was comparably present in both cell types after 24h incubation (Figure 5A). Higher magnification analyses highlighted that in COS-7 cells expressing hERG, Tat protein did not enter the cells. In marked contrast, in hiPS-CMs, Tat was found both in the cytoplasm and/or vesicular structures that are presumably endocytic elements as well as colocalized with hERG proteins, at the plasma membrane (Figure 5B). Altogether, these experiments in hiPS-CMs show that Tat, when applied at biologically relevant concentrations is able to affect PIP_2 availability, thereby affecting I_{Kr} current.

Since Tat also affects transfected KCNE1-KCNQ1, which is related to the cardiac I_{Ks} current, we set out to study the effect of Tat on I_{Ks} in native tissue. However, in our model of cardiomyocytes differentiated from hiPS cells, we did no observe any tail current in presence of 1 µM E-4031 (not shown), suggesting that KCNE1 and/or KCNQ1 subunits are not expressed/functional in this model. We also applied 1 µM epinephrine to enhance this current [35, 36] but again, no tail was observed in 1 µM E-4031.

Table 2: Tat reduces I_{Kr} recorded from hiPS-CMs: biophysical characteristics.

Tat incubated	iPS-CMs-I_{Kr}	
	Buffer	Tat 200 ng/ml
Current density	(15)	(15)
at 60 mV (pA/pF)	0.93 ± 0.18	0.64 ± 0.23*
Activation	(21)	(13)
$V_{1/2}$ (mV)	-23.7 ± 1.6	-22.7 ± 1.7
K (mV)	5.7 ± 0.5	5.7 ± 0.4

(n): number of cells; Student t-test, *: $p < 0.05$; $V_{1/2}$ and K: voltage for half-activation or -inactivation of the K^+ currents and slope.

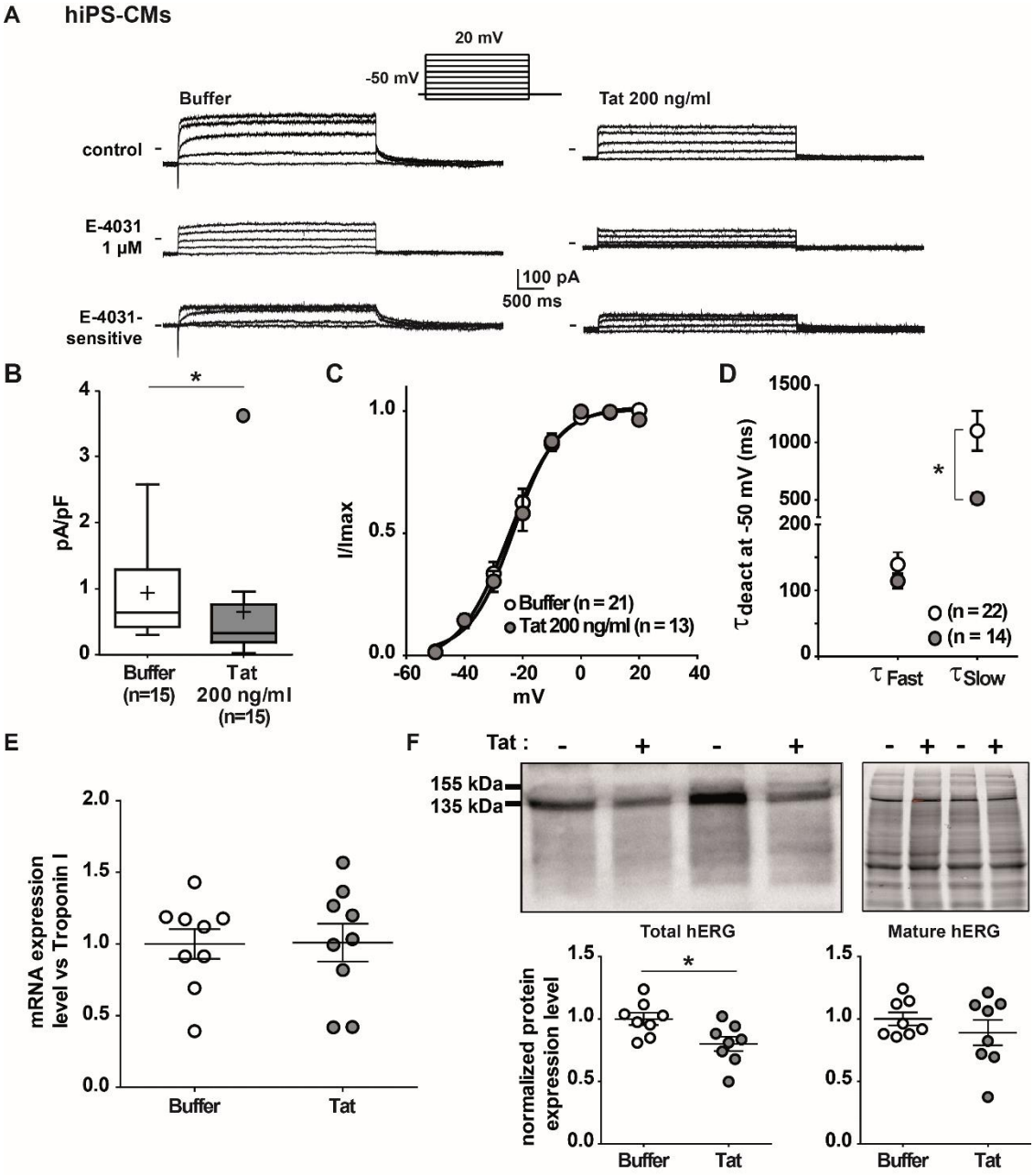


Figure 4: Tat reduces I_{Kr} recorded from hiPS-CMs. (A) Representative superimposed currents recorded from hiPS-CMs incubated with buffer (left) or 200 ng/ml WT-Tat (Tat; right), before (control) and after 1 µM E-4031 application. The E-4031-sensitive current, I_{Kr}, was obtained by digital subtraction of the current recorded after E-4031 application to the one recorded before application (inset: voltage-clamp protocol). (B) Tukey boxplots presenting I_{Kr} tail current density measured at -50 mV after depolarization at +60 mV. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$. (C) I_{Kr} activation curves measured from the tail currents. (D) Averaged time constants of fast and slow deactivation upon repolarization at -50 mV. Student t-test: * $p < 0.05$. The fast component represents around 50% of the deactivating current in both conditions. (E) hERG mRNA expression level *versus* Troponin I mRNA. (F) Top left: Western blot analysis of hERG protein expression in hiPS-CMs. Two hERG specific bands were revealed (mature, glycosylated membrane subunit, 155 kDa, and immature, non-glycosylated cytoplasmic subunit, 135kDa). Top right: stain-free expression served as internal control of gel loading. Bottom: normalized intensity quantification of the total and mature hERG bands in hiPS-CMs. Student t-test: * $p < 0.05$.

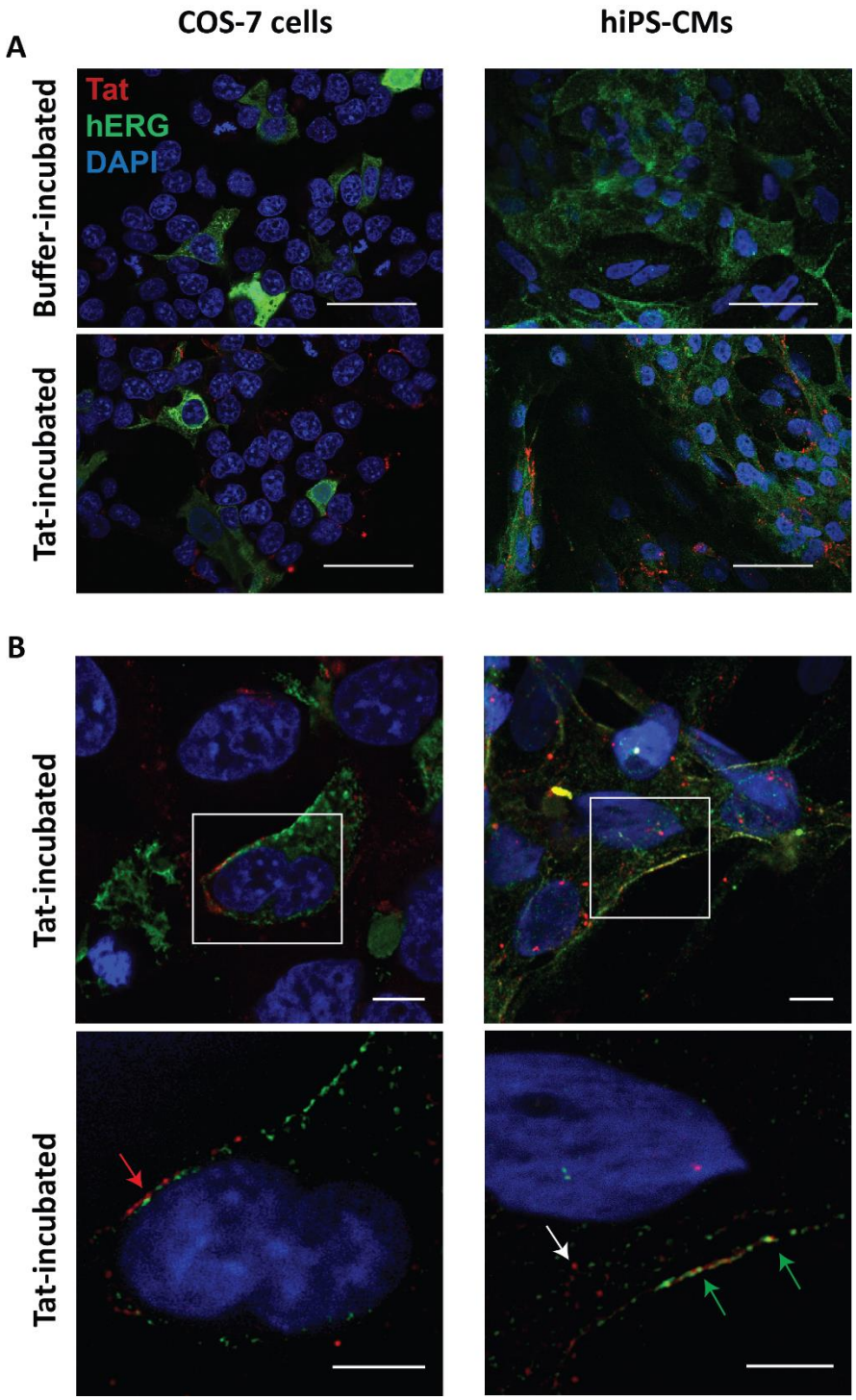


Figure 5: Tat enters hiPS-CMs but not COS-7 cells. (A) Representative confocal immunostainings of Tat (red) and hERG (green). Left: COS-7 cells expressing hERG. Right: hiPS-CMs. Top: cells incubated with control buffer. Bottom: cells incubated with Tat. Scale = 50 μm. (B) Top: Representative confocal immunostainings of Tat-incubated COS-7 cells and hiPS-CMs. Bottom: Representative SIM immunostainings, showing that Tat remains in the extracellular compartment of COS-7 cells (red arrow) while in hiPS-CMS, Tat is located inside the cytoplasm (white arrow) and colocalizes with hERG at the plasma membrane (green arrows). Scale = 5 μm.

In addition to hERG and KCNQ1, PIP_2 has been shown to modulate the activity of a plethora of ion channels [37], yet it is possible that many of these channels are not affected by PIP_2 if variations are limited to its physio/pathophysiological range [38]. To address this issue, we tested the effect of Tat on several channels suggested to be regulated by PIP_2. PIP_2 has previously been shown to modulate the L-type Ca^{2+} current, $I_{Ca,L}$, in neurons and in natural killer cells [39, 40] and $Ca_V1.2$ and $Ca_V1.3$ in heterologous expression system [41]. We investigated Tat effects on the L-type Ca^{2+} current in hiPS-CMs. Tat incubation did not modify $I_{Ca,L}$ density or biophysical properties (Figure 6), showing that endogenous Ca^{2+} channels activity is not affected by Tat in hiPS-CMs. This observation suggests that hiPS-CM Ca^{2+} channels are not as sensitive as hERG to a decrease in available PIP_2.

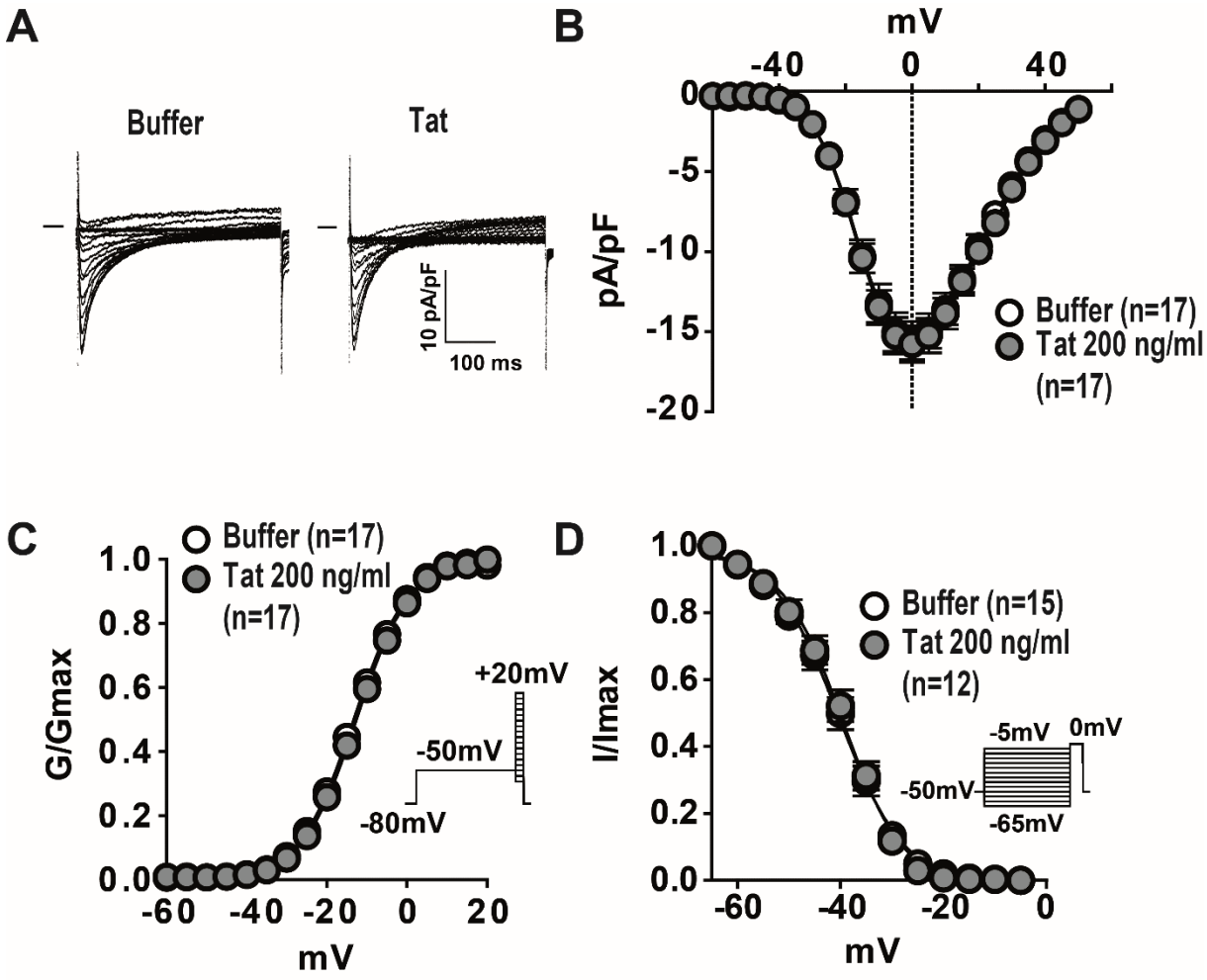
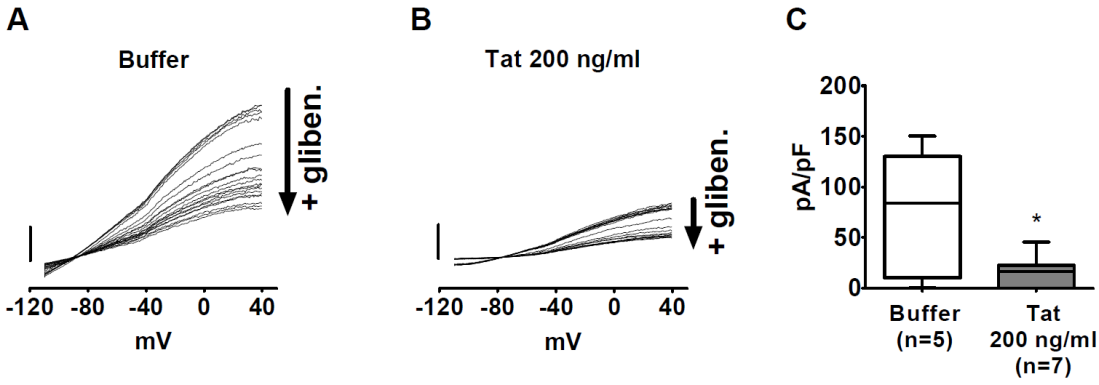


Figure 6: Tat has no effect on $I_{Ca,L}$ recorded in hiPS-CMs. (A) Representative superimposed currents recorded from hiPS-CMs incubated with buffer or 200 ng/ml WT-Tat (Tat). (B) Current density-voltage relationship. (C) $I_{Ca,L}$ activation curves. (D) Voltage-dependence of inactivation.

In order to evaluate if Tat also alters the activity of an inward rectifier channel, we chose a channel which has a low apparent affinity to PIP_2. Such channel, which is less stabilized by PIP_2 is more prone to a decrease in activity when available PIP_2 is decreased [42]. Thus we selected the K_{ATP} channel, since the alpha-subunit of this channel, Kir6.2, has a low affinity to PIP_2 and is more prone to be sensitive toTat [42]. As no K_{ATP} current was detected in the hiPS-CMs as a glibenclamide-sensitive outward current measured at +40 mV, we used neonatal mouse cardiomyocytes, in which a 24 h incubation with 200 ng/ml Tat led to a decrease in the K_{ATP} current (Supplemental figure 5). This suggests that Tat may lead to a remodeling of the electrical activity of cardiomyocytes through an alteration of the activity of several PIP_2-sensitive channels.



Supplemental figure 5: Tat induces a decrease in I_{KATP} recorded in mouse neonatal cardiomyocytes. (A) & (B). Representative superimposed currents recorded from hiPS-CMs incubated with buffer (A) or 200 ng/ml WT-Tat (B), during 20 µmol/l glibenclamide perfusion. Vertical bar, 500 pA. For clarity, only every other trace is shown. (C) Tukey boxplots presenting I_{KATP} current density measured as the glibenclamide sensitive current measured at the end of a 350 ms pulse to +40 mV. Mann-Whitney test: * $p < 0.05$.

3.4. Tat related reduction of I_{Kr} is not due to a reduction in membrane hERG

Since Tat has been shown to interfere with protein expression in host cells [43], it may also act on hERG through a reduction in its expression. To test whether Tat directly alters expression of native hERG in hiPS-CMs, we performed qRT-PCR and western blot analyses. While no reduction of hERG mRNA was observed, total hERG protein amount was reduced by about 20% only (Figure 4 E & F). Moreover, the mature (*i.e.* glycosylated) fraction responsible for the K^+ current [44], was not significantly reduced (Figure 4F), suggesting that inhibition of

hERG protein expression is not responsible for hERG current decrease and that in cardiomyocytes also, Tat incubation mostly affects hERG gating.

3.5. Tat modifies the electrical activity of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells

Action potentials (APs) were then recorded using the permeabilized patch configuration in hiPS-CMs. Three types of AP shapes were obtained and categorized as nodal-, atrial-, and ventricular-like APs (Table 3). Since LQTS is associated with ventricular AP prolongation, we focused on ventricular-like APs paced at two cycle lengths. As illustrated in Figure 7A, APs were prolonged in hiPS-CMs incubated for 24 h with 200 ng/ml Tat. Only APD_{70} and APD_{90} were prolonged as expected with hERG inhibition ($p < 0.05$; Figure 7B). In addition, most Tat-incubated cells showed a higher APD_{90} dispersion compared to cells incubated with buffer (Figure 8). This dispersion resulted from AP duration and amplitude alternans (Figure 6A). APD_{90} alternans were exacerbated at faster stimulation rates (shorter PCLs; Figure 8B).

Table 3: Quantitative parameters used for classification of action potentials obtained from patch-clamp experiments on control cells.

MDP: Maximum diastolic potential. dV/dt_{max} : maximum upstroke velocity.

hiPS-CM APs	**AP amplitude (mV)**	**MDP (mV)**	**Peak to peak duration (ms)**	**dV/dt_{max} (V/s)**	**APD_{90} (ms)**	**$(APD_{30}–APD_{40})/(APD_{70}–APD_{80})$**	**APD_{50}/APD_{90}**
Nodal-like (n=4)	63.0 ± 4.4	-41.7 ± 3.7	650.1 ± 147	2.1 ± 0.4	174.4 ± 2.5	2.3 ± 0.2	0.6 ± 0.002
Atrial-like (n=7)	77.3 ± 2.2	-47.2 ± 1.5	901.2 ± 188.5	4.4 ± 0.5	215.9 ± 22.9	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.001
Ventricular-like (n=9)	**102.6 ± 3.1**	**-58.6 ± 2.1**	**1301.2 ± 310.8**	**10.9 ± 1.2**	**269.4 ± 30.1**	**4.9 ± 0.7**	**0.8 ± 0.02**

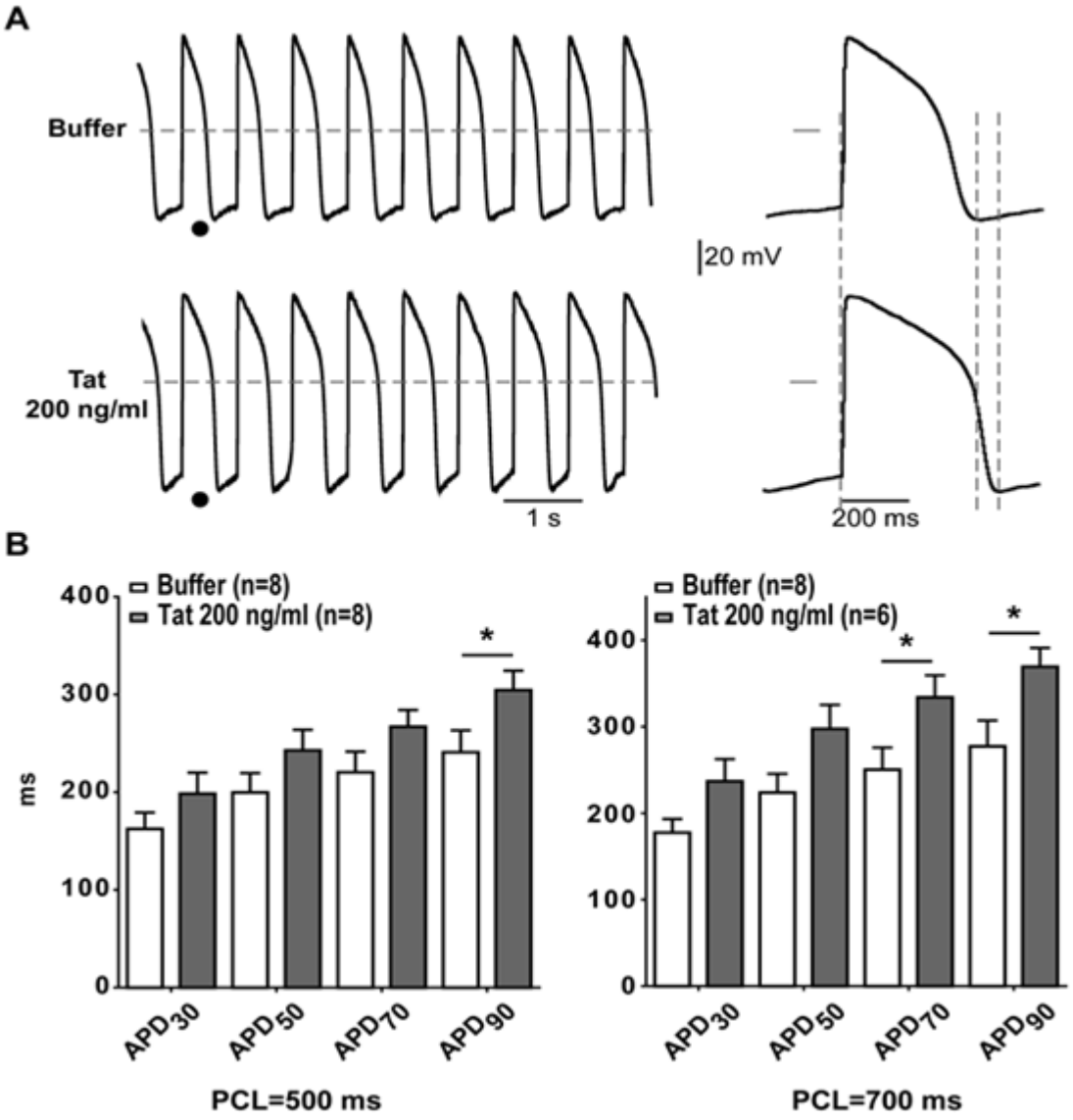


Figure 7: Tat significantly increases ventricular-like action potential durations in hiPS-CMs. (A) Left, representative ventricular-like APs recorded from hiPS-CMs incubated with buffer or 200 ng/ml WT-Tat (Tat), stimulated at a pacing cycle length (PCL) of 700 ms. Right, expanded APs tagged ● in left panel. Horizontal dashed lines and bars: 0 mV. Vertical dashed lines stress the duration differences. (B) Averaged AP duration at 30 (APD_{30}), 50 (APD_{50}), 70 (APD_{70}) and 90% (APD_{90}) of full repolarization measured in ventricular-like cells incubated with buffer or WT-Tat at 2 different PCLs. * : $p < 0.05$ (Holm-Sidak post-hoc test).

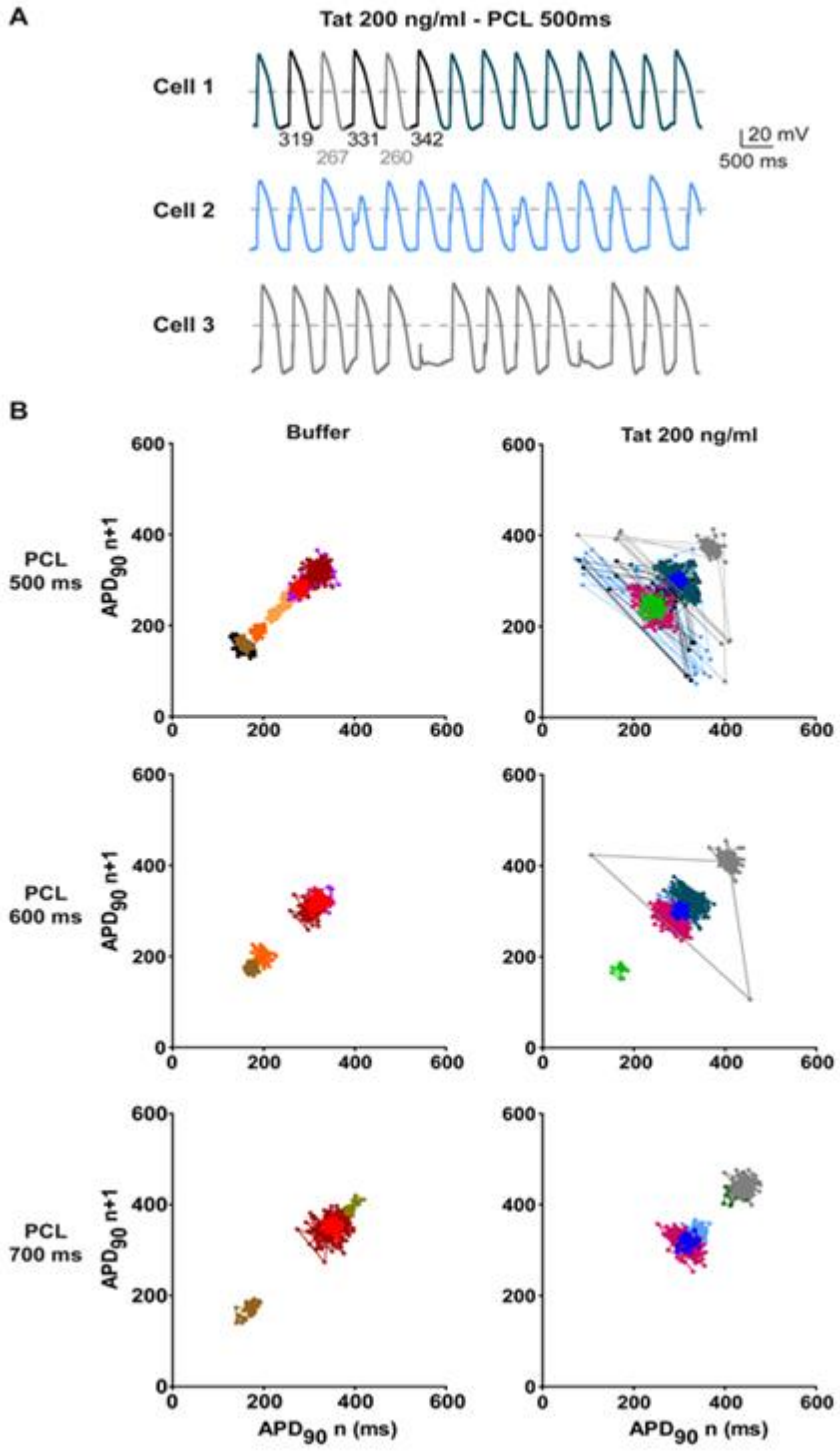


Figure 8: Tat incubation leads to alternans events in ventricular-like hiPS-CMs. (A) Representative ventricular-like action potentials recorded from three different hiPS-CMs incubated with 200 ng/ml WT-Tat (Tat). Cell 1: APD_{90} of five consecutive APs are indicated below. (B) Poincaré plots of APD_{90} (one color per cell) recorded at three different PCLs. The graphs show APD_{90} of each AP (number n+1) *versus* the APD_{90} of its preceding one (n). Same color code used in A.

DISCUSSION

HIV Tat binds PIP_2 with a very high affinity, the K_d being 20 to 50 times lower than the K_d of the phospholipase C pleckstrin homology domain, one of the best cellular ligands for PIP_2 [18]. Knowing that hERG and KCNQ1 currents are modulated by membrane PIP_2 levels, we tested whether Tat can affect those currents by sequestering PIP_2. Co-transfecting Tat with either channel led to modification of the biophysical parameters in accordance with a decrease in available PIP_2. Moreover, the W11Y-Tat mutant, which is 300 times less affine for PIP_2 [18], has no effect on the activity of both channels. Importantly, W11Y-Tat loss of PIP_2 affinity does not alter its native transactivation activity [23], suggesting that loss of effect of W11Y-Tat on channel activity hERG and KCNE1-KCNQ1 is rather due to the interaction with PIP_2 than through another mechanism, such as the regulation of gene expression. Since W11Y-Tat is not localized to the membrane, one might argue that WT-Tat effects may be mediated through alternative mechanisms independent of PIP_2, such as a direct interaction with the ion channels of interest. However, a KCNE1-KCNQ1 mutant which is not sensitive to PIP_2 is not affected by Tat, confirming that Tat acts by sequestering PIP_2. Incubation of hiPS-derived cardiomyocytes with WT-Tat also leads to a decrease in I_{Kr} and acceleration of deactivation, consistent with a decrease in available PIP_2. Finally, the cells electrical activity is affected through delayed repolarization and AP alternans. Altogether, these results indicate that Tat may affect cardiomyocytes repolarization through an interaction with PIP_2, reducing the major repolarizing currents I_{Kr} and I_{Ks}. Those results are particularly significant as, despite the proven effect of PIP_2 on the gating of many channels, the relevance of such a regulation in physiological or pathophysiological conditions is still questioned. It has been suggested that in cardiac cells, PIP_2 levels are not affected enough by PLC-coupled receptors to alter I_{Kr} and I_{Ks} [38]. This work enlightens a pathophysiological condition where I_{Kr} is indeed reduced through a decrease in available PIP_2. We also show that other PIP_2-sentitive channels, such as the K_{ATP} channel [45] may also be affected. Since this channel is implicated in the ischemic preconditioning, this could explain at least partly the increase in acute myocardial infarction in HIV-patients adjusted for hypertension, diabetes, and dyslipidemia [46]. In human cardiomyocytes, we did not observe any effect of Tat incubation on the transient calcium current I_{CaL}, despite its described PIP_2 sensitivity [41]. This observation supports the hypothesis that channel activity is differentially modulated depending on its affinity for PIP_2 [47].

Tat incubation affected I_{Kr} in human cardiomyocytes, but not in COS-7 and HEK293 models. This highlights the usefulness of hiPS-derived cardiomyocytes as a more reliable model than heterologous systems. Most importantly, it validates the use of hiPS-CMs to study cardiac non-genetic diseases such as infectious diseases like AIDS. One could consider the absence of detectable I_{Ks} in non-stimulated condition as a limit of this model. But this characteristic makes this model closer to hardly available human cardiomyocytes [48, 49] as compared to guinea pig cardiomyocytes [50] in which I_{Ks} presents a much larger contribution to the repolarizing currents without any adrenergic stimulus.

Bai and collaborators did observe an effect of Tat incubation on hERG current amplitude in a similar HEK293 model as we used [16]. However, these authors used a short isoform of Tat encoded by the first exon of the protein only (72 residues; Tat-72). The Tat protein used in our study is a 86 residues long (Tat-86), two-exon form of Tat that is present in viral isolates [34]. Although both Tat-72 and Tat-86 contain the transactivation domain, and are frequently used for *in vitro* studies, Tat-86 is more readily taken up than Tat-72 by various cell types [51]. In addition, the second exon endows Tat with additional activities and is critical for both *in vitro* and *in vivo* HIV replication [52]. Therefore, the use of Tat-86 appears to be more relevant to evaluate HIV impact on human cardiomyocyte electrical activity.

In LQT patients, T-wave alternans mirroring ventricular AP alternans are associated with delayed repolarization and are a known risk factor for sudden death [53]. In hiPS-derived cardiomyocytes, Tat incubation resulted in a significant reduction in I_{Kr} current, associated with ventricular AP prolongation, as would be expected, and alternans occurrence. Up to now, human AP alterations could be addressed with *in silico* studies only. For example, similar AP prolongation at low rate and APD alternans at elevated rate were observed when I_{Kr} alterations due to a human LQT-related hERG mutation were implemented in a mathematical model of the human ventricular action potential [54]. Similarly, mild reduction in repolarization reserve due to alteration of I_{Kr} parameters led to APD alternans using another *in silico* model [55]. These results are also in agreement with the observations in canine cardiomyocytes of AP alternans suppression by overexpression of hERG [56]. However, *in silico* or animal models are limited to investigate the potential multiple effects of actors such as Tat on their various mechanistic targets, in a situation far more complex than a single mutation.

In conclusion, this study strongly suggests that PIP_2 is the link between HIV-Tat and the cardiac arrhythmias observed in HIV-positive individuals. In neurosecretory cells, it has been proposed that Tat perturbs the recruitment of several PIP_2-dependent key players of the exocytotic machinery [32]. Combined with this previous investigation, our work suggests a general remodeling of PIP_2-dependent processes by HIV *via* Tat. It would be interesting to test whether other processes, immune or not immune, are also affected by Tat through PIP_2.

DISCLOSURES

None

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the iPS cell core facility and MicroPiCell facility of SFR Santé F. Bonamy (Nantes), the Nikon Center of Excellence of Nantes, Patricia Charpentier from Therassay facility, Béatrice Leray, and Morteza Erfanian for their technical support.

SOURCES OF FUNDING

This work was funded by grants from the *Fédération Française de Cardiologie*, the *Fondation Génavie*, the Marie Curie European Actions (PIIF-GA-2012-331436 and PIOF-GA-2011-298280) and the *French Regional Council of Pays-de-la-Loire* (Regional grant VACARME - www.vacarme-project.org). Dr Z. Es-Salah-Lamoureux was supported by grants from the Lefoulon Delalande Foundation, the *Fondation pour la Recherche Médicale* (SPF20111223614; *FRM*) and the *Fondation Genavie*. M. Jouni was awarded a scholarship from the Association of Scientific Orientation and Specialization (ASOS). Olfat Malak was laureate of the Line Pomaret-Delalande prize of the *Fondation pour la Recherche Médicale* (PLP20141031304; *FRM*).

REFERENCES

[1] Zwahlen M, Harris R, May M, Hogg R, Costagliola D, de WF et al. Mortality of HIV-infected patients starting potent antiretroviral therapy: comparison with the general population in nine industrialized countries. Int J Epidemiol 2009;38:1624-33.

[2] April MD, Wood R, Berkowitz BK, Paltiel AD, Anglaret X, Losina E et al. The survival benefits of antiretroviral therapy in South Africa. J Infect Dis 2014;209:491-9.

[3] World Health Oganization. Towards universal access : scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector : progress report 2008. 2008. 1-7-2015.
Ref Type: Report

[4] World Health Oganization. Global update on the health sector response to HIV, 2014. 1-7-2014. 1-7-2015.
Ref Type: Report

[5] Tseng ZH, Secemsky EA, Dowdy D, Vittinghoff E, Moyers B, Wong JK et al. Sudden cardiac death in patients with human immunodeficiency virus infection. J Am Coll Cardiol 2012;59:1891-6.

[6] Goldberg RJ, Bengtson J, Chen ZY, Anderson KM, Locati E, Levy D. Duration of the QT interval and total and cardiovascular mortality in healthy persons (The Framingham Heart Study experience). Am J Cardiol 1991;67:55-8.

[7] Qaqa AY, Shaaban H, DeBari VA, Phung S, Slim J, Costeas CA et al. Viral load and CD4+ cell count as risk factors for prolonged QT interval in HIV-infected subjects: a cohort-nested case-control study in an outpatient population. Cardiology 2010;117:105-11.

[8] Reinsch N, Buhr C, Krings P, Kaelsch H, Neuhaus K, Wieneke H et al. Prevalence and risk factors of prolonged QTc interval in HIV-infected patients: results of the HIV-HEART study. HIV Clin Trials 2009;10:261-8.

[9] Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C et al. The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2000;21:1216-31.

[10] Fantoni M, Autore C, Del BC. Drugs and cardiotoxicity in HIV and AIDS. Ann N Y Acad Sci 2001;946:179-99.

[11] Vallecillo G, Mojal S, Roquer A, Martinez D, Rossi P, Fonseca F et al. Risk of QTc prolongation in a cohort of opioid-dependent HIV-infected patients on methadone maintenance therapy. Clin Infect Dis 2013;57:1189-94.

[12] Charbit B, Rosier A, Bollens D, Boccara F, Boelle PY, Koubaa A et al. Relationship between HIV protease inhibitors and QTc interval duration in HIV-infected patients: a cross-sectional study. Br J Clin Pharmacol 2009;67:76-82.

[13] Kocheril AG, Bokhari SA, Batsford WP, Sinusas AJ. Long QTc and torsades de pointes in human immunodeficiency virus disease. Pacing Clin Electrophysiol 1997;20:2810-6.

[14] Hanna Z, Kay DG, Cool M, Jothy S, Rebai N, Jolicoeur P. Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. J Virol 1998;72:121-32.

[15] Brouillette J, Grandy SA, Jolicoeur P, Fiset C. Cardiac repolarization is prolonged in CD4C/HIV transgenic mice. J Mol Cell Cardiol 2007;43:159-67.

[16] Bai YL, Liu HB, Sun B, Zhang Y, Li Q, Hu CW et al. HIV Tat protein inhibits hERG K+ channels: a potential mechanism of HIV infection induced LQTs. J Mol Cell Cardiol 2011;51:876-80.

[17] Poggi A, Carosio R, Fenoglio D, Brenci S, Murdaca G, Setti M et al. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. Blood 2004;103:2205-13.

[18] Rayne F, Debaisieux S, Yezid H, Lin YL, Mettling C, Konate K et al. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. EMBO J 2010;29:1348-62.

[19] Charpentier F, Merot J, Loussouarn G, Baro I. Delayed rectifier K(+) currents and cardiac repolarization. J Mol Cell Cardiol 2010;48:37-44.

[20] Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K+ channels. EMBO J 2003;22:5412-21.

[21] Rodriguez N, Amarouch MY, Montnach J, Piron J, Labro AJ, Charpentier F et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP(2)) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. Biophys J 2010;99:1110-8.

[22] Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. Mol Biol Cell 2004;15:2347-60.

[23] Yezid H, Konate K, Debaisieux S, Bonhoure A, Beaumelle B. Mechanism for HIV-1 Tat insertion into the endosome membrane. J Biol Chem 2009;284:22736-46.

[24] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology 2010;51:297-305.

[25] Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK et al. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. Circ Res 2012;111:1125-36.

[26] Jouni M, Si-Tayeb K, Es-Salah-Lamoureux Z, Latypova X, Champon B, Caillaud A et al. Toward Personalized Medicine: Using Cardiomyocytes Differentiated From Urine-Derived Pluripotent Stem Cells to Recapitulate Electrophysiological Characteristics of Type 2 Long QT Syndrome. J Am Heart Assoc 2015;4:e002159.

[27] Terrenoire C, Wang K, Tung KW, Chung WK, Pass RH, Lu JT et al. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. J Gen Physiol 2013;141:61-72.

[28] Loussouarn G, Baro I, Escande D. KCNQ1 K+ channel-mediated cardiac channelopathies. Methods Mol Biol 2006;337:167-83.

[29] Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. Anal Biochem 2013;433:105-11.

[30] Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. Anal Biochem 2014;467:1-3.

[31] Coyan FC, Abderemane-Ali F, Amarouch MY, Piron J, Mordel J, Nicolas CS et al. A long QT mutation substitutes cholesterol for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in KCNQ1 channel regulation. PLoS One 2014;9:e93255.

[32] Tryoen-Toth P, Chasserot-Golaz S, Tu A, Gherib P, Bader MF, Beaumelle B et al. HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. J Cell Sci 2013;126:454-63.

[33] Debaisieux S, Lachambre S, Gross A, Mettling C, Besteiro S, Yezid H et al. HIV-1 Tat inhibits phagocytosis by preventing the recruitment of Cdc42 to the phagocytic cup. Nat Commun 2015;6:6211.

[34] Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. Traffic 2012;13:355-63.

[35] Christ T, Horvath A, Eschenhagen T. LQT1-phenotypes in hiPSC: Are we measuring the right thing? Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:E1968.

[36] Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. N Engl J Med 2010;363:1397-409.

[37] Logothetis DE, Petrou VI, Adney SK, Mahajan R. Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. Pflugers Arch 2010;460:321-41.

[38] Kruse M, Hille B. The phosphoinositide sensitivity of the K(v) channel family. Channels (Austin) 2013;7:530-6.

[39] Napier TC, Chen L, Kashanchi F, Hu XT. Repeated cocaine treatment enhances HIV-1 Tat-induced cortical excitability via over-activation of L-type calcium channels. J Neuroimmune Pharmacol 2014;9:354-68.

[40] Zocchi MR, Rubartelli A, Morgavi P, Poggi A. HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. J Immunol 1998;161:2938-43.

[41] Suh BC, Leal K, Hille B. Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Neuron 2010;67:224-38.

[42] Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, Logothetis DE. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. J Biol Chem 2004;279:37271-81.

[43] Wright CM, Felber BK, Paskalis H, Pavlakis GN. Expression and characterization of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus. Science 1986;234:988-92.

[44] Lin EC, Moungey BM, Lim E, Concannon SP, Anderson CL, Kyle JW et al. Mouse ERG K(+) channel clones reveal differences in protein trafficking and function. J Am Heart Assoc 2014;3:e001491.

[45] Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. Science 1998;282:1138-41.

[46] Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:2506-12.

[47] Hernandez CC, Falkenburger B, Shapiro MS. Affinity for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determines muscarinic agonist sensitivity of Kv7 K+ channels. J Gen Physiol 2009;134:437-48.

[48] Iost N, Virag L, Opincariu M, Szecsi J, Varro A, Papp JG. Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. Cardiovasc Res 1998;40:508-15.

[49] Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P et al. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. Circulation 2005;112:1392-9.

[50] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J Gen Physiol 1990;96:195-215.

[51] Ma M, Nath A. Molecular determinants for cellular uptake of Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 in brain cells. J Virol 1997;71:2495-9.

[52] Smith SM, Pentlicky S, Klase Z, Singh M, Neuveut C, Lu CY et al. An in vivo replication-important function in the second coding exon of Tat is constrained against mutation despite cytotoxic T lymphocyte selection. J Biol Chem 2003;278:44816-25.

[53] Zareba W, Moss AJ, le CS, Hall WJ. T wave alternans in idiopathic long QT syndrome. J Am Coll Cardiol 1994;23:1541-6.

[54] Schweigmann U, Biliczki P, Ramirez RJ, Marschall C, Takac I, Brandes RP et al. Elevated heart rate triggers action potential alternans and sudden death. translational study of a homozygous KCNH2 mutation. PLoS One 2014;9:e103150.

[55] Fox JJ, McHarg JL, Gilmour RF, Jr. Ionic mechanism of electrical alternans. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;282:H516-H530.

[56] Hua F, Johns DC, Gilmour RF, Jr. Suppression of electrical alternans by overexpression of HERG in canine ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;286:H2342-H2351.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Nadjet BELBACHIR

Mécanismes physiopathologiques du syndrome de Brugada

Physiopathological mechanisms of Brugada syndrome

Résumé

Le syndrome de Brugada est un trouble du rythme cardiaque héréditaire qui mène à l'apparition de fibrillations ventriculaires et à la mort subite cardiaque. Seulement 30% des cas atteints de ce syndrome sont liés à des mutations génétiques et ce à cause de la complexité du phénotype engendré. Le gène RRAD a été identifié dans une famille qui compte 5 membres atteints du syndrome de Brugada, tous porteurs du variant p.R211H. Ce gène code pour la protéine G monomérique Rad dont le rôle principal est de réguler le courant calcique de type L dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Cette étude associe trois modèles d'étude visant à discriminer l'implication de Rad dans le phénotype des patients atteints : Un modèle de surexpression pour étudier le rôle de Rad et l'impact de sa surexpression sur l'activité électrique et la structure des cardiomyocytes, des cardiomyocytes dérivés de cellules IPS reprogrammées des patients porteurs de la mutation pour en déterminer le phénotype cellulaire, et un modèle de souris knock in pour la mutation p.R211H généré dans le but d'intégrer le phénotype cellulaire à l'échelle de l'organe entier. Les résultats obtenus sur les trois modèles, montrent que Rad R211H provoque des troubles au niveau de l'activité électrique du coeur mais aussi au niveau de la structure des cellules différenciées et ces troubles se traduisent par des anomalies à l'ECG chez la souris. Cette étude est la première à démontrer l'implication de Rad GTPase dans le syndrome de Brugada et la seule à démontrer, à ce jour, des perturbations du cytosquelette dans cette pathologie qui est toujours considérée comme une pathologie exclusivement rythmique.

Mots clés

Syndrome de Brugada – Rad GTPase - IPSC – ICaL- INa- Actine – Vinculine - EAD

Abstract

Brugada syndrome (BrS) is a rare inherited cardiac disorder linked to high risk of ventricular arrhythmias and sudden death. In the present day, only 30% of BrS cases have known genetic causes. Most of these mutations have been identified in the SCN5A gene that encodes the cardiac voltage-gated sodium channel NaV1.5. We identified a rare variant in the RRAD gene encoding for the small G protein Rad GTPase, in a familial case of BrS. The aim of this work was to elucidate the mechanisms by which the RRAD p.R211H variant could lead to BrS. First, an overexpressing model was developed using neonatal mouse cardiomyocytes to define the involvement of Rad in the electrical function of cardiomyocytes. Then, cardiac cells were derived from human induced pluripotent stem cells reprogrammed from the carriers of the Rad mutation in order to investigate the phenotype induced at the cellular level. Furthermore, a knock in mouse has been generated to study the impact of this same mutation on the organ level. The three models summarized in a complementary way the phenotype caused by the Rad mutation on the electrical activity at the cellular and the organ levels. The mutation seem to trigger structural defects in the cardiomyocytes that can be involved in the electrical defects related to the disease. The present study is the first report of the potential link between Rad GTPase and BrS. The phenotype reported recapitulates the classical electrophysiological signature of the disease but also associates cytoskeleton disturbances.

Key Words

Brugada Syndrome – Rad GTPase - IPSC – ICaL- INa- Actine – Vinculine - EAD