



Electrophysiologie moléculaire - troubles du rythme et de la conduction cardiaques



Isabelle BARÓ, PhD

Equipe Canaux ioniques et arythmies
cardiaques

L'unité de recherche de l'institut du thorax

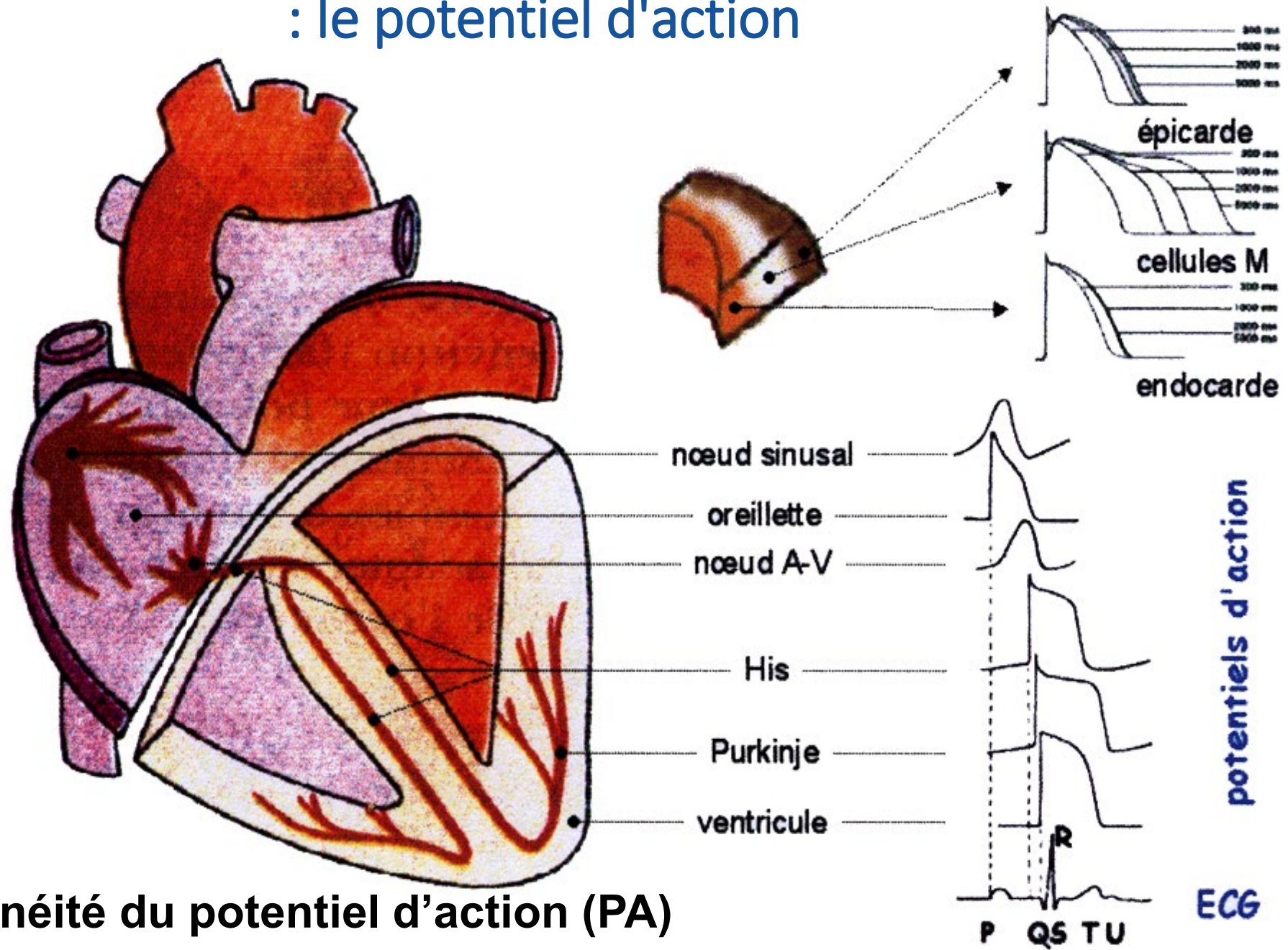
Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Nantes, France

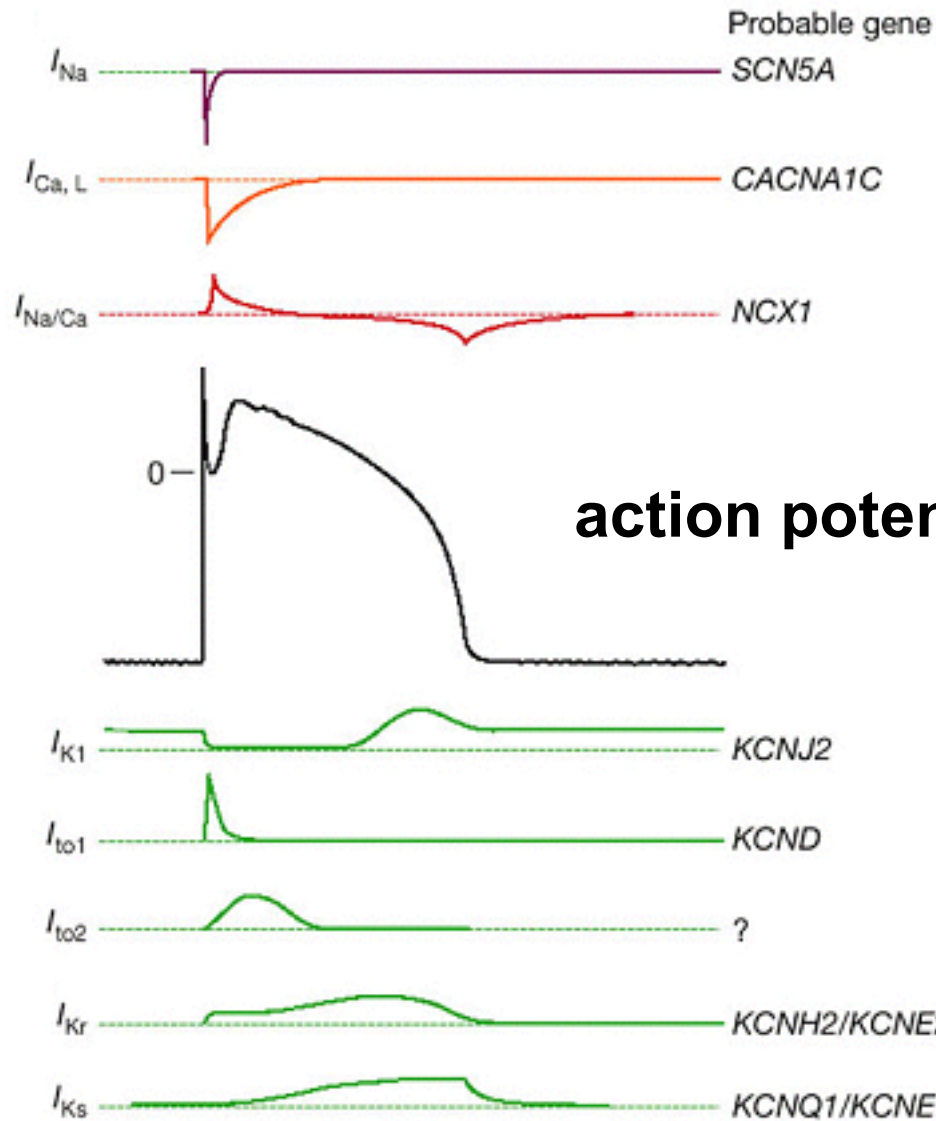
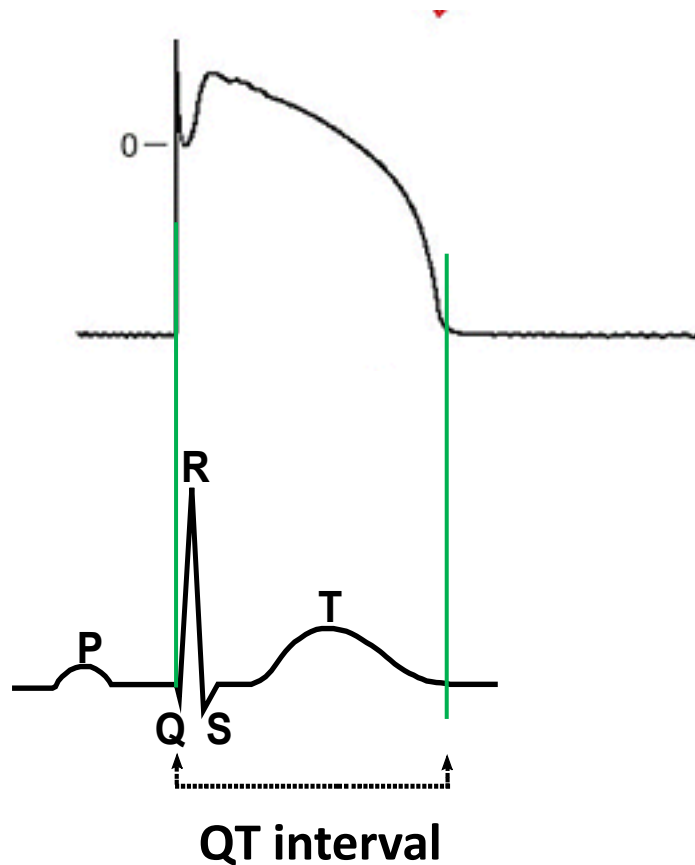
MASTER 1 Biologie et Santé - Thorax

2024-2025

Activité électrique du cardiomyocyte : le potentiel d'action



Activité électrique du cardiomyocyte ventriculaire : le potentiel d'action



early depolarization

plateau

action potential

diastolic potential

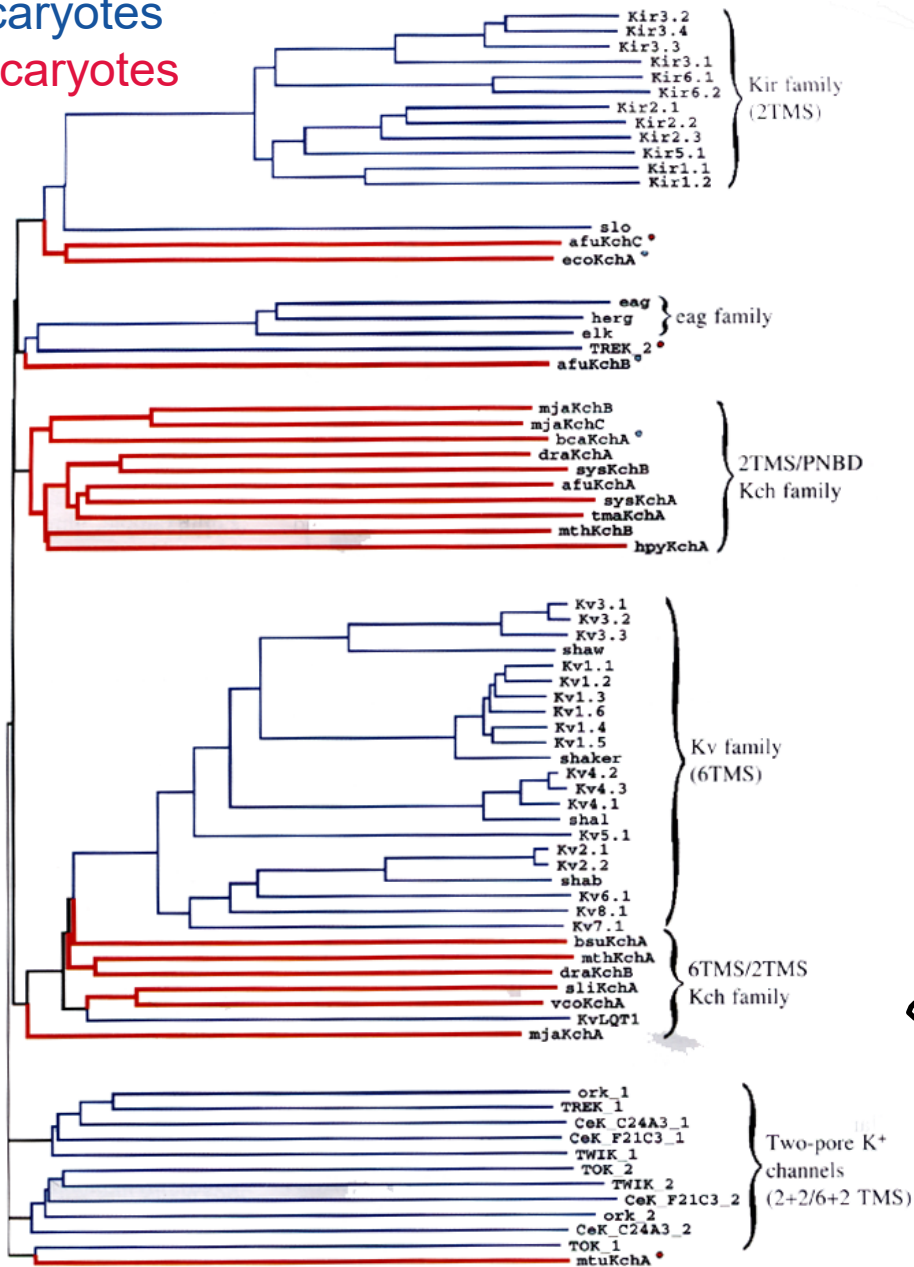
early repolarization

late repolarization

dendrogramme

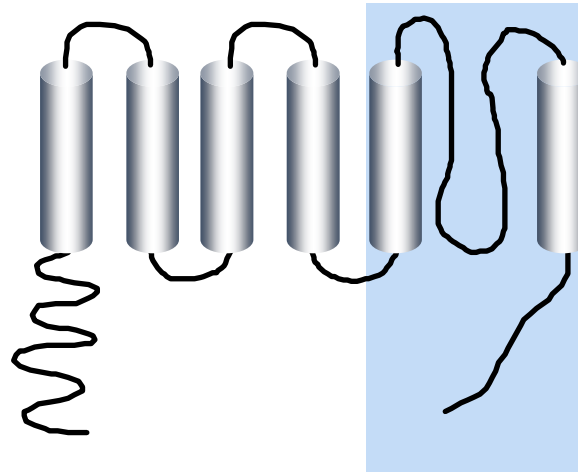
Canaux potassiques

eucaryotes
procaryotes

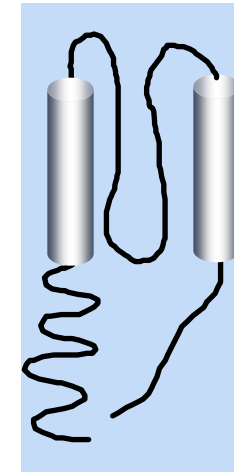


→ 3 classes

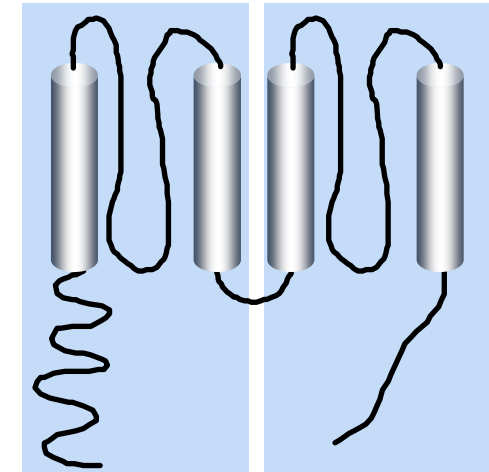
6 segments
transmembranaires
(TMS)
et 1 boucle du pore



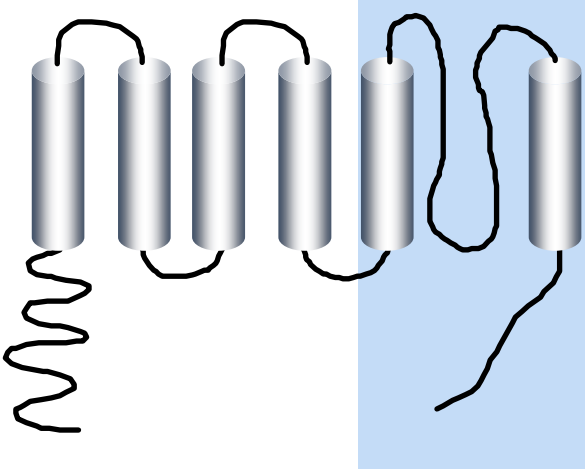
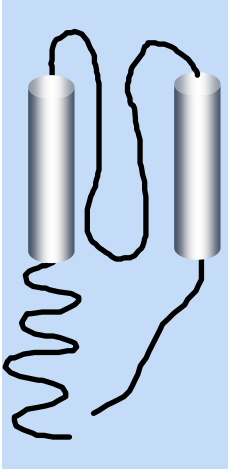
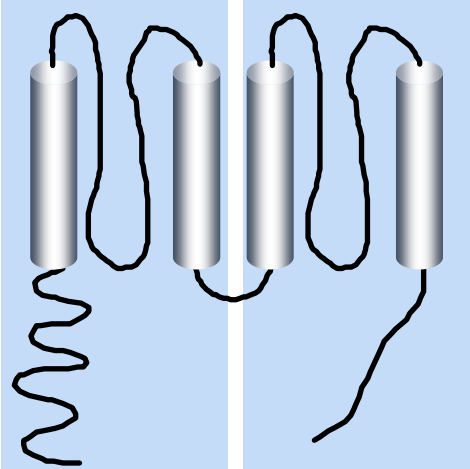
2 TMS
et 1 boucle du
pore



4 TMS
et 2 boucles du
pore



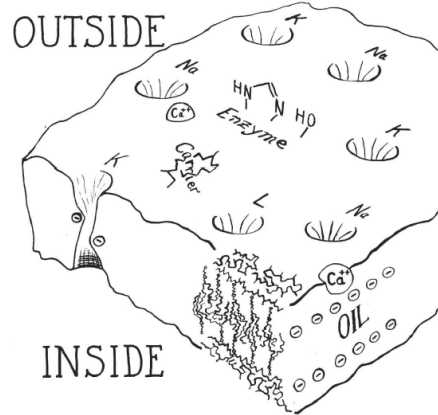
3 classes de canaux K⁺

	6 segments transmembranaires (TMS) et 1 boucle du pore	2 TMS et 1 boucle du pore	4 TMS et 2 boucles du pore
Trace hydropathie			
Structure	tétramère	tétramère	dimère
Régulateurs	principalement V_{membrane}	principalement ligand: ATP, Prot G	stimuli physiques chimiques
Cibles	V_{membrane}; [ion]		

De l'hypothèse à la structure cristallographique d'un canal

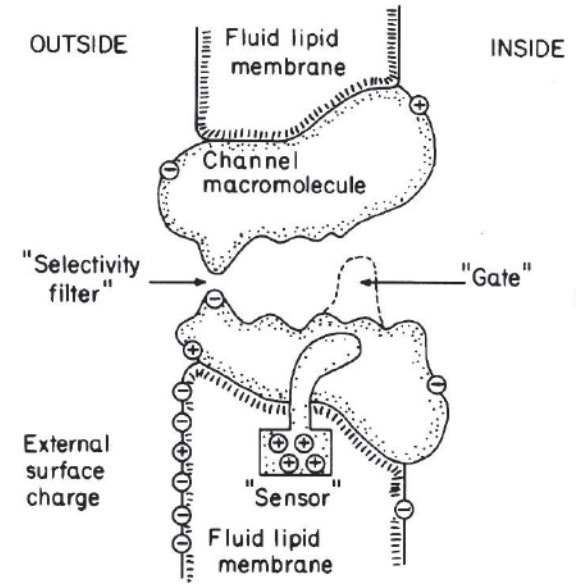
Hypothèse de travail (1967)

Hille B. 1967. A pharmacological analysis of the ionic channels of nerve. PhD thesis, Rockefeller Univ., New York



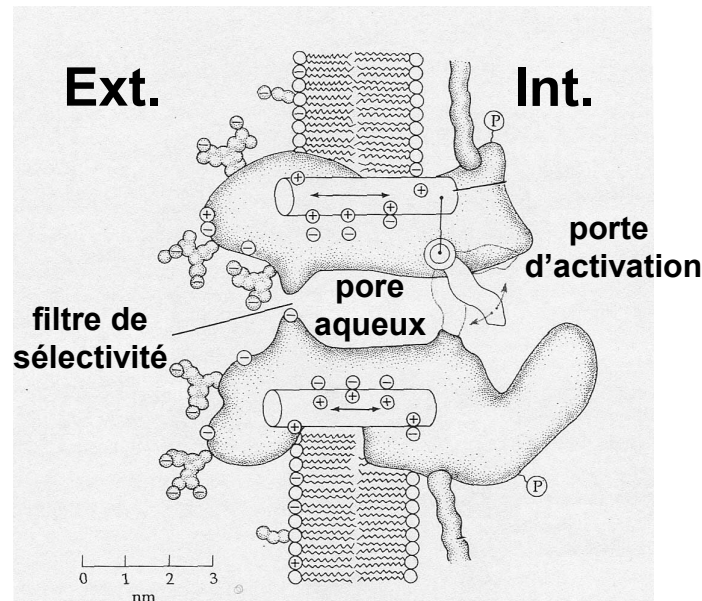
Hypothèse de travail (1977)

Hille B. 1977 J. Gen. Physiol. 69:497–515



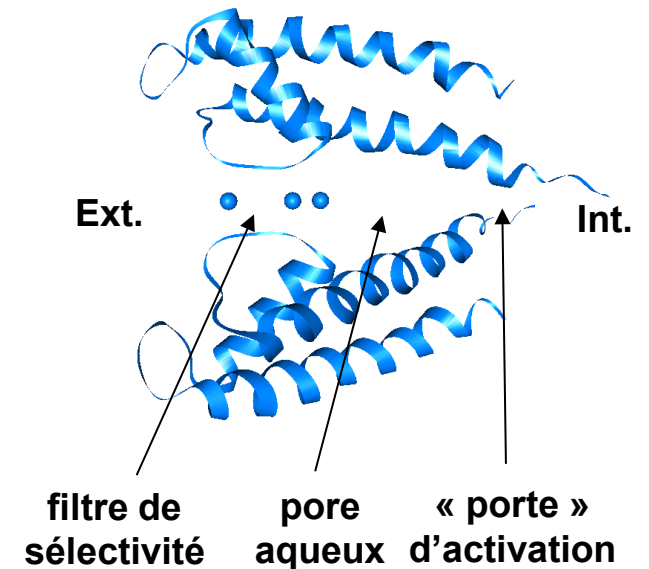
Hypothèse de travail (1992)

Hille B *in* Ionic Channels of Excitable Membranes (2nd edition). 1992; Sinauer Associated, MA 01375, U.S.A.

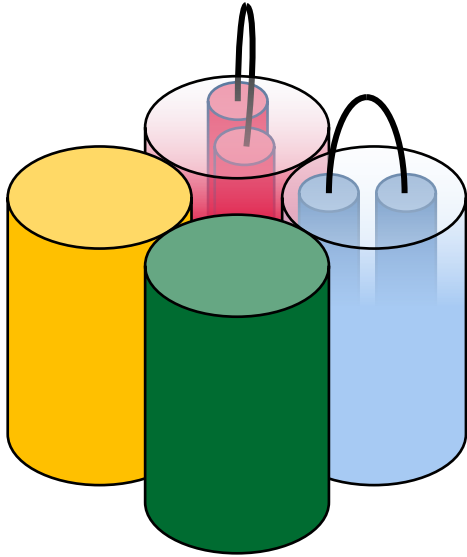


Structure de KcsA (1998)

from Doyle DA *et al.* Science. 1998 Apr 3;280(5360):69-77

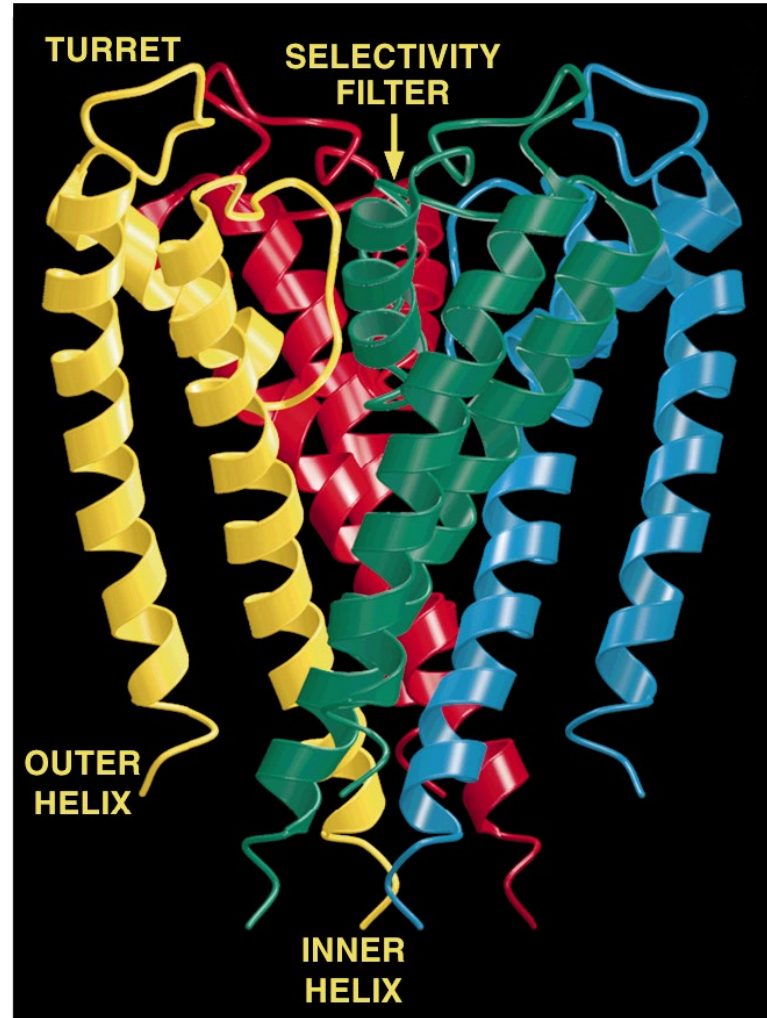


Structure cristallographique d'un canal K^+ à 2 TMS et 1 pore

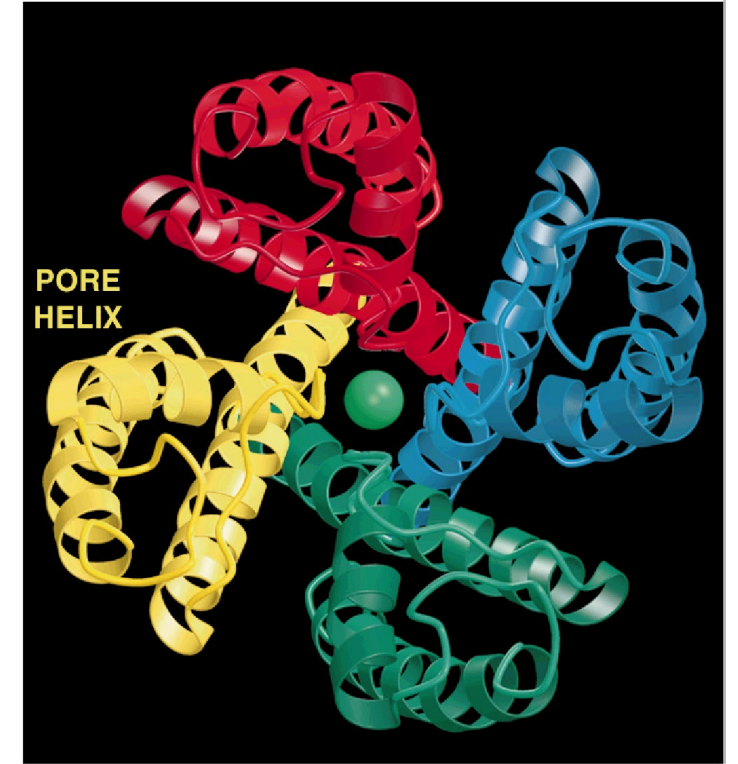


Tétramères

KcSA



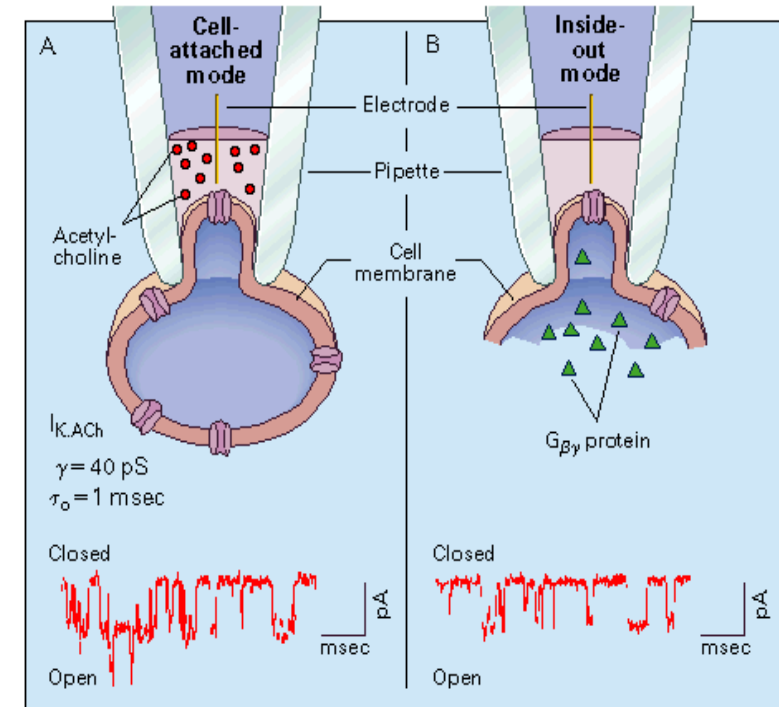
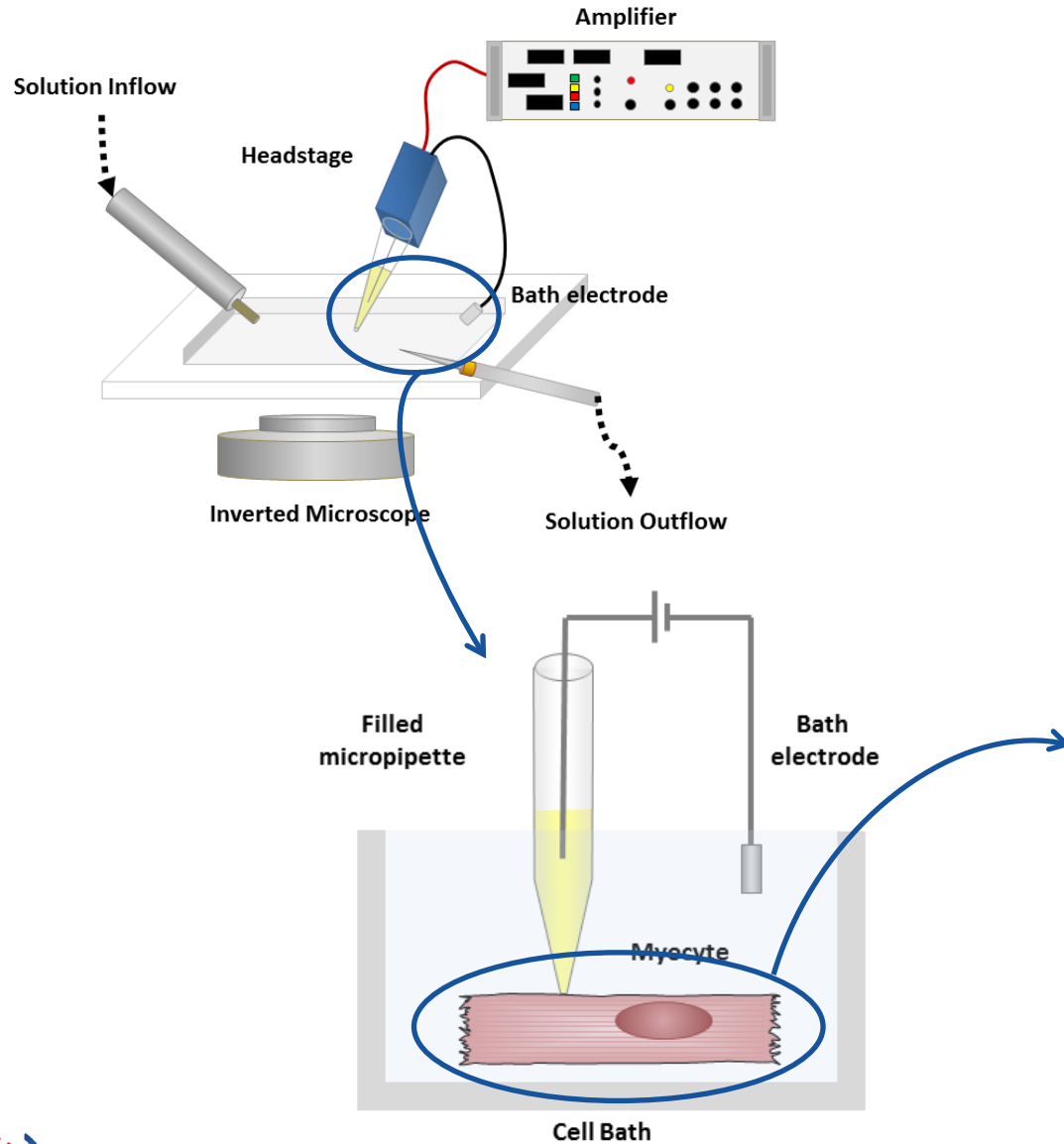
(resolution: 3.2 Å)



Prix Nobel de Chimie 2003 :
Roderick Mac Kinnon

D'après Doyle DA *et al.* Science. 1998 Apr 3;280(5360):69-77

Enregistrement d'un courant unitaire : le patch-clamp



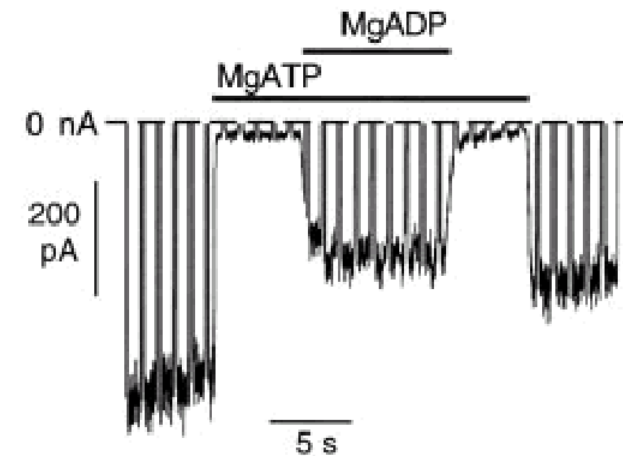
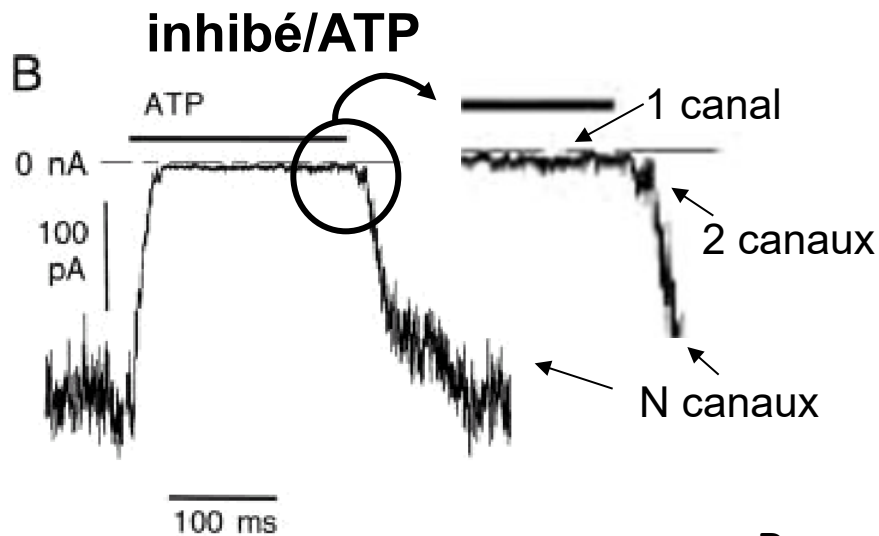
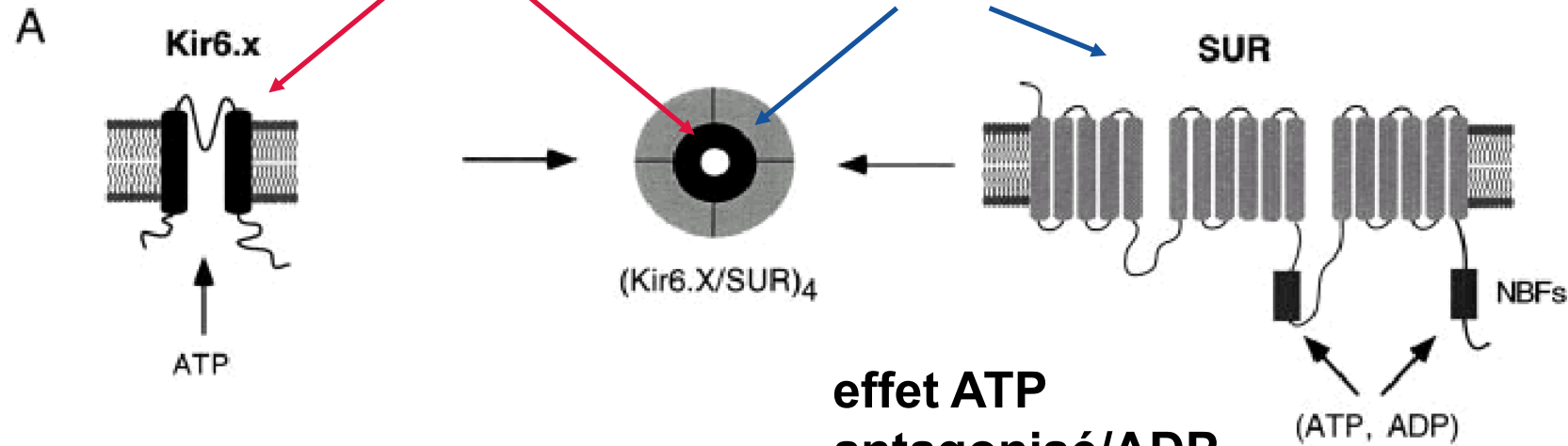
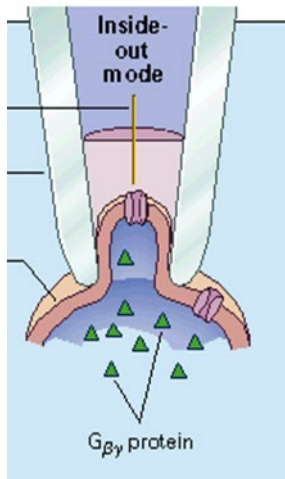
Prix Nobel de Physiologie 1991 : Erwin Neher & Bert Sakmann

canaux K_{ATP} du pancréas (cellules β des îlots de Langerhans)

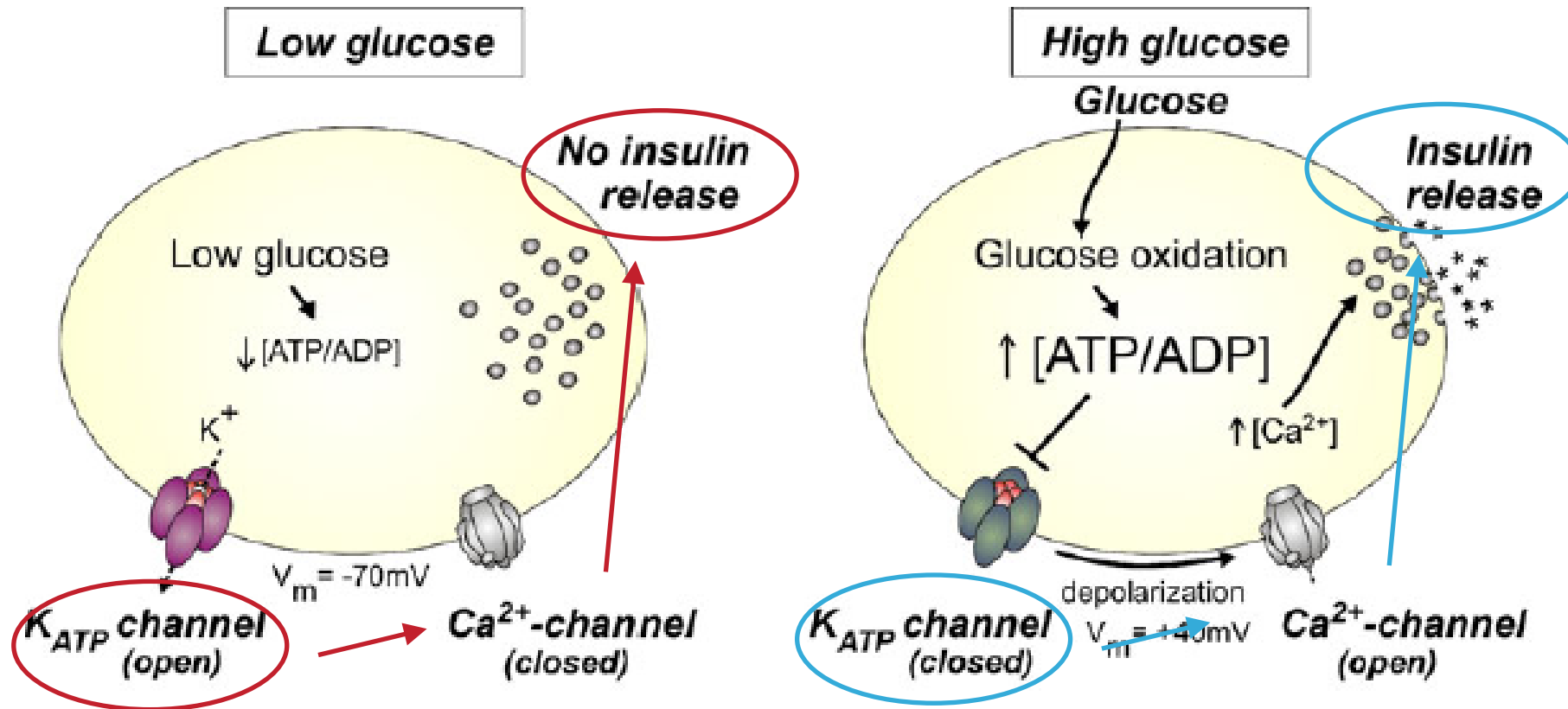
C \rightleftharpoons O
fermé ouvert

sous-unité α : pore

sous-unité β : auxiliaire

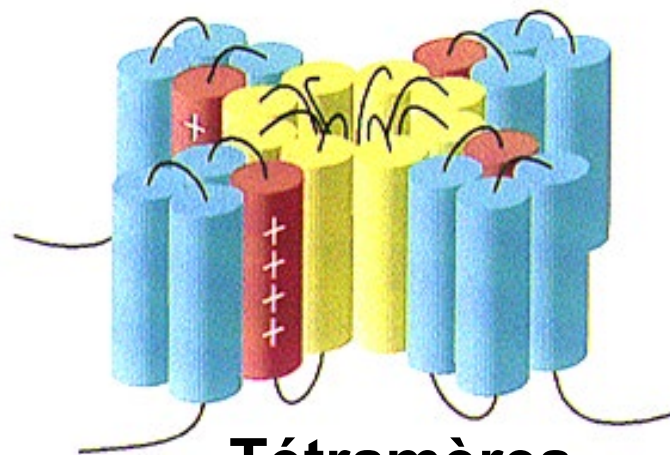
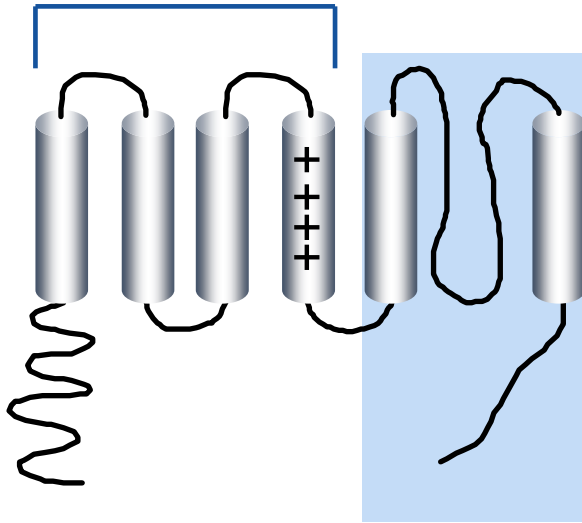


canaux K_{ATP} du pancréas (cellules β) rôle dans la sécrétion d'insuline



Structure d'un canal K^+ 6 TMS et 1 pore

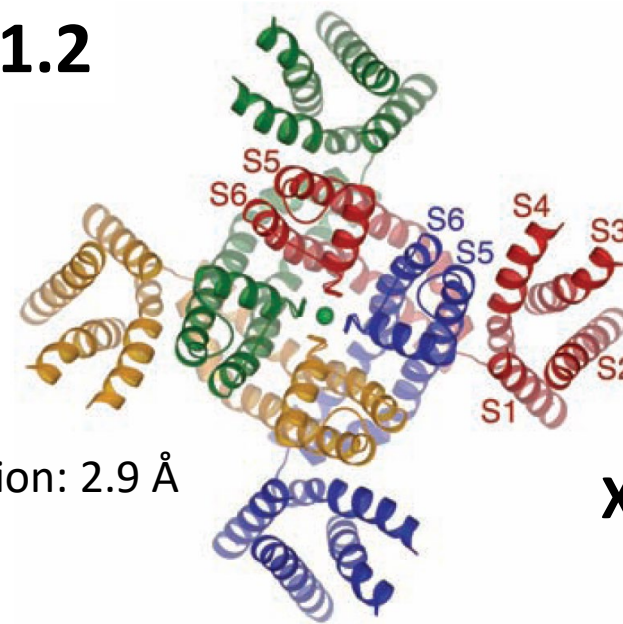
voltage sensor



Tétramères

Kv1.2

resolution: 2.9 Å

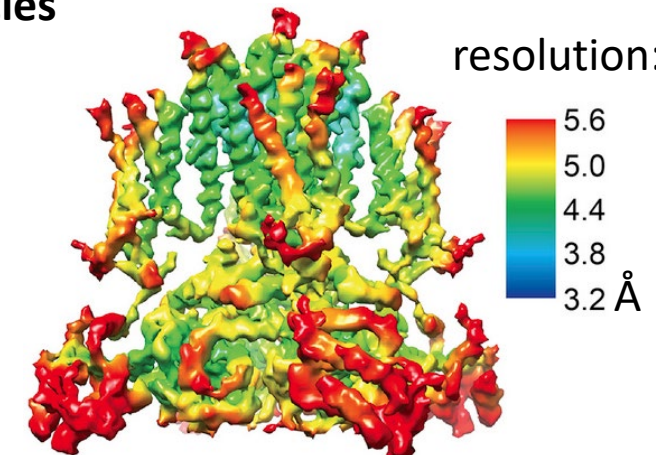
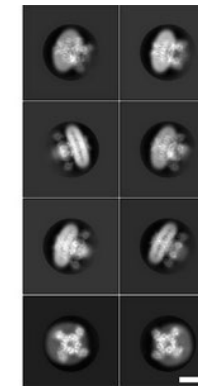
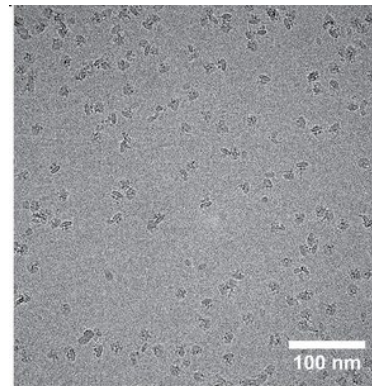


Long SB *et al.* Science. 2005 Aug 5;309(5736):897-903.

X-ray crystallography

hERG

~144,000 particles



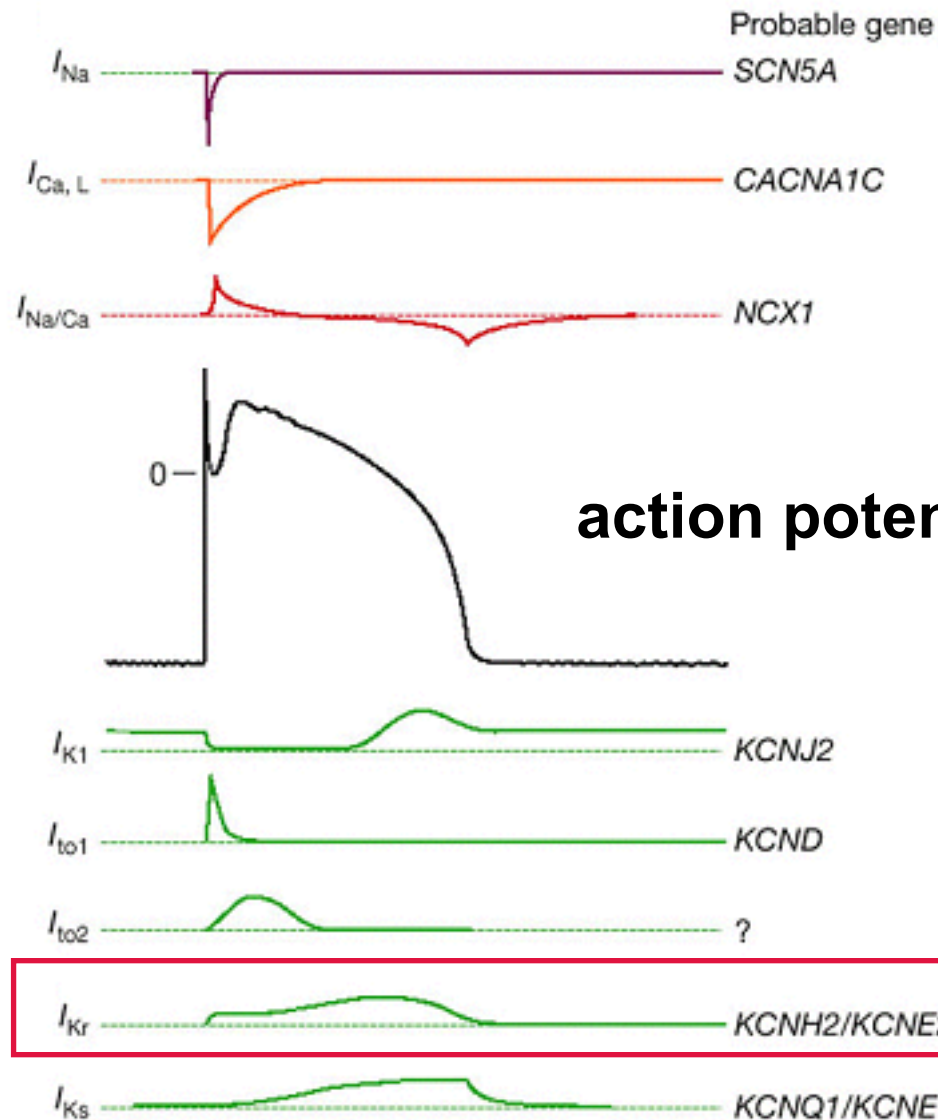
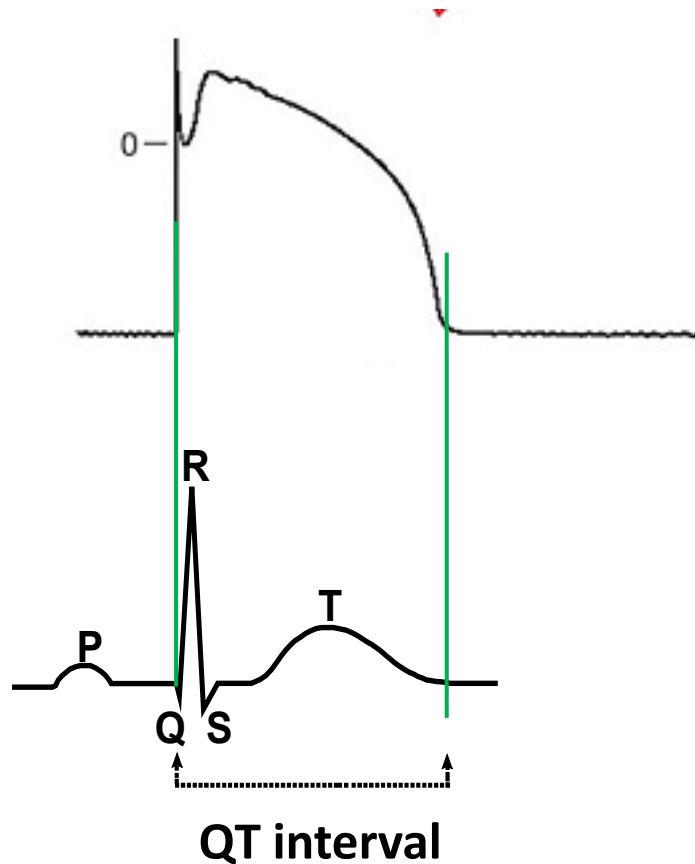
resolution:

5.6
5.0
4.4
3.8
3.2 Å

Cryo-electron microscopy

Wang W *et al.* Cell. 2017 Apr 20;169(3):422-430.e10.

Activité électrique du cardiomyocyte ventriculaire : le potentiel d'action



early depolarization

plateau

action potential (AP)

diastolic potential

early repolarization

late repolarization

Etude d'une mutation de hERG associée au Syndrome du QT long

- Syndrome du QT long (ECG : intervalle QTc > 450-470 ms), fibrillation ventriculaire (torsades de pointes), mort subite

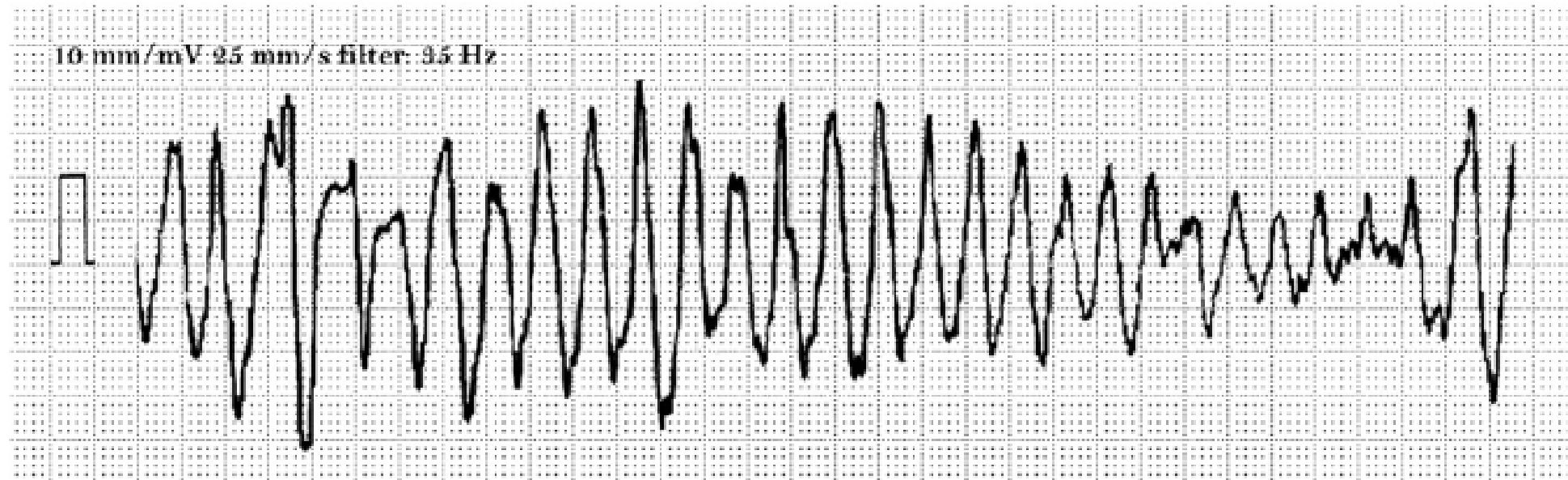


Fig. 1. ECG recording showing an ongoing episode of Torsade de pointes. This polymorphic ventricular arrhythmia is characterized by the progressive rotation of the electrical axis (180 ° in about 10–12 cycles) which shows on the surface ECG as the sinusoidal undulation of the electrical signal.

Etude d'une mutation de hERG associée au Syndrome du QT long

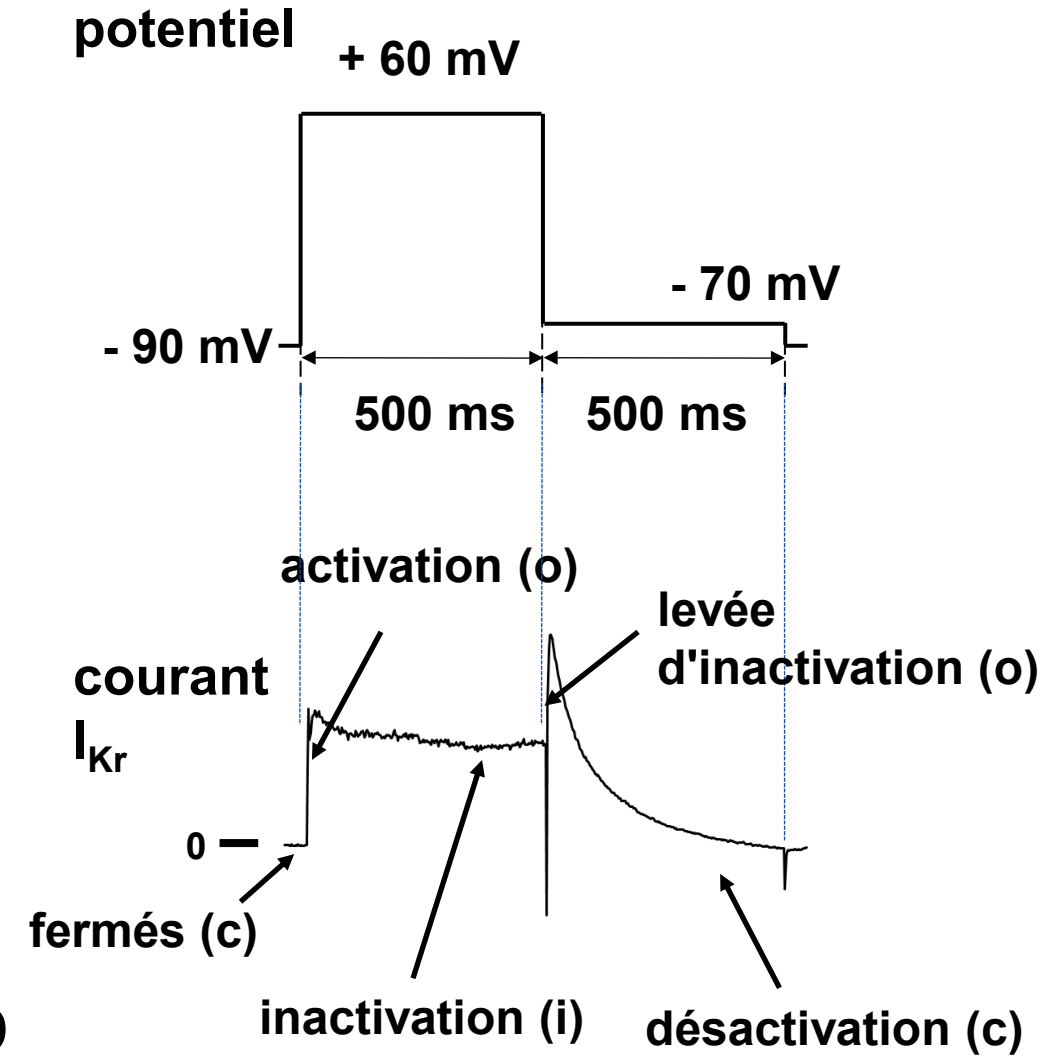
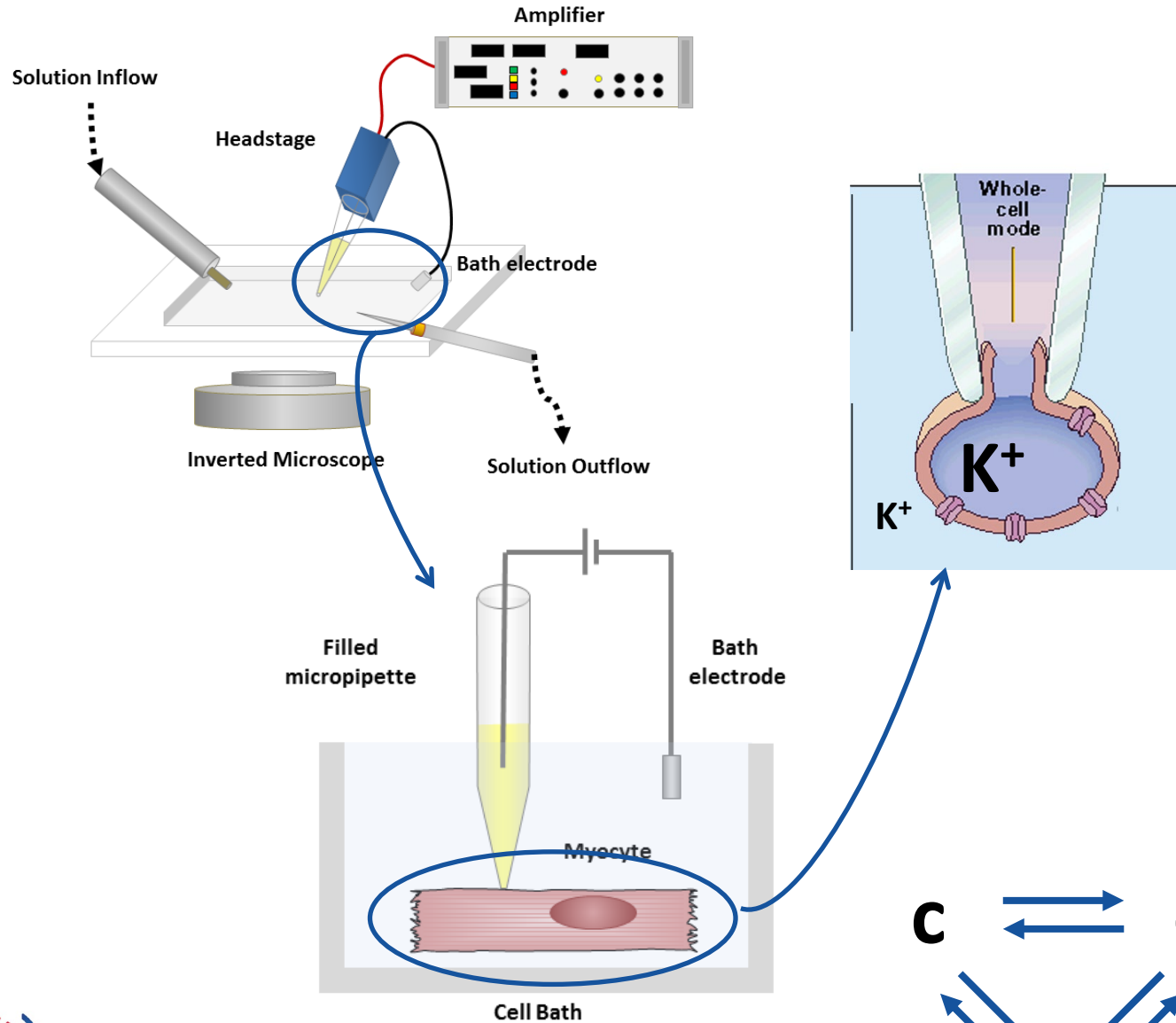
Table 1 Classification of genes responsible for cardiac channelopathies. Adapted from Schwartz et al. [2]

LQTS type	Gene	Mutation frequency among LQTS population (%)	Locus	Protein (functional effect)
Romano–Ward (RWS) <i>mut/WT</i>				
LQT1	KCNQ1	40–55	11p15.5	K _V 7.1 (↓)
LQT2	KCNH2	30–45	7q35–36	K _V 11.1 (↓)
LQT3	SCN5A	5–10	3p21–24	Na _V 1.5 (↑)
LQT4	ANKB	< 1	4q25–27	Ankyrin B (↓)
LQT5	KCNE1	< 1	21q22.1	MinK (↓)
LQT6	KCNE2	< 1	21q22.1	MiRP1 (↓)
LQT7	KCNJ2	< 1	17q23	Kir2.1 (↓)
LQT8	CACNA1C	< 1	12p13.3	L-type calcium channel (↑)
LQT9	CAV3	< 1	3p25	Caveolin 3 (↓)
LQT10	SCN4B	< 1	11q23.3	Sodium channel-β4 (↓)
LQT11	AKAP9	< 1	7q21–22	Yotiao (↓)
LQT12	SNTA1	< 1	20q11.2	Syntrophin α1 (↓)
LQT13	KCNJ5	< 1	11q24	Kir3.4 (↓)
LQT14	CALM1	< 1	14q32.11	Calmodulin 1 (dysfunctional Ca ²⁺ signaling)
LQT15	CALM2	< 1	2p21	Calmodulin 2 (dysfunctional Ca ²⁺ signaling)
Jervell and Lange-Nielsen syndrome (JLNS) <i>mut/mut</i>				
JLN1	KCNQ1	< 1	11p15.5	K _V 7.1 (↓)
JLN2	KCNE1	< 1	21q22.1–22.2	MinK (↓)

Arrows up (↑) or down (↓) showing gain or loss of protein function, respectively

LQT long QT, *RWS* Romano–Ward syndrome, *JLNS* Jervell and Lange-Nielsen syndrome

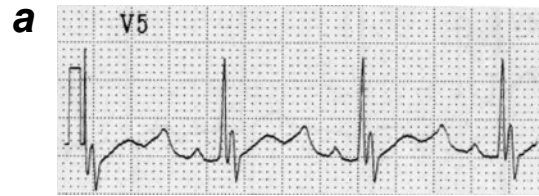
Enregistrement d'un courant trans-membranaire : le patch-clamp



Etude d'une mutation de hERG associée au Syndrome du QT long

Propositus : fibrillation ventriculaire (torsades de pointes)

▼ Feb-05-99 – clobutinol

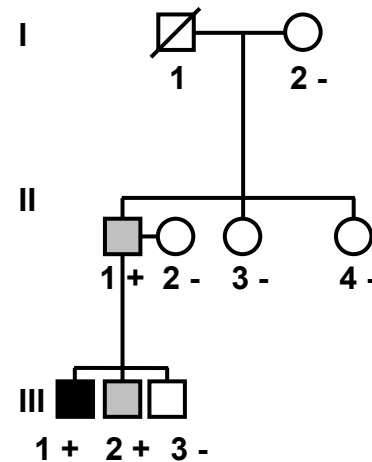


◀ May-30-97
597 ms
(628 ms)

1 mV
400 ms



Génotypage



+ : hERG **A561P**
- : hERG WT

← causal ?

porteur hétérozygote :

Modèles cellulaires

- Lignées cellulaires modifiées - canalopathies monogéniques

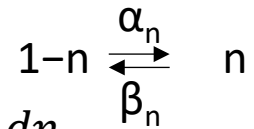
expression hétérologue de protéines WT et mutées

Modèles *in silico*

- Modèle de potentiel d'action ventriculaire humain Priebe and Beuckelmann (1998) -
modèle d'Hodgkin et Huxley (Prix Nobel de Physiologie 1963)

perte/gain de fonction :
allongement → causal

$$I_K = n^4 \bar{g}_K (V - E_K)$$



$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n$$

Rapidly Activating Current: I_{Kr}

$$I_{Kr} = g_{Kr, \max} \cdot X_r \cdot r_{ik} \cdot (V - E_K)$$

$$E_K = (RT/F) \cdot \ln([K^+]_o/[K^+]_i)$$

$$g_{Kr, \max} = 0.015 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$\alpha_{Xr} = \{0.005 \cdot \exp[5.266 \cdot 10^{-4} \cdot (V + 4.067)]\} /$$

$$\{1 + \exp[-0.1262 \cdot (V + 4.067)]\}$$

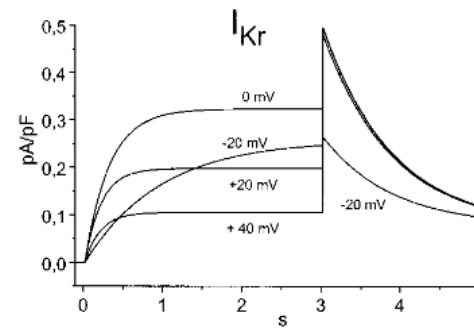
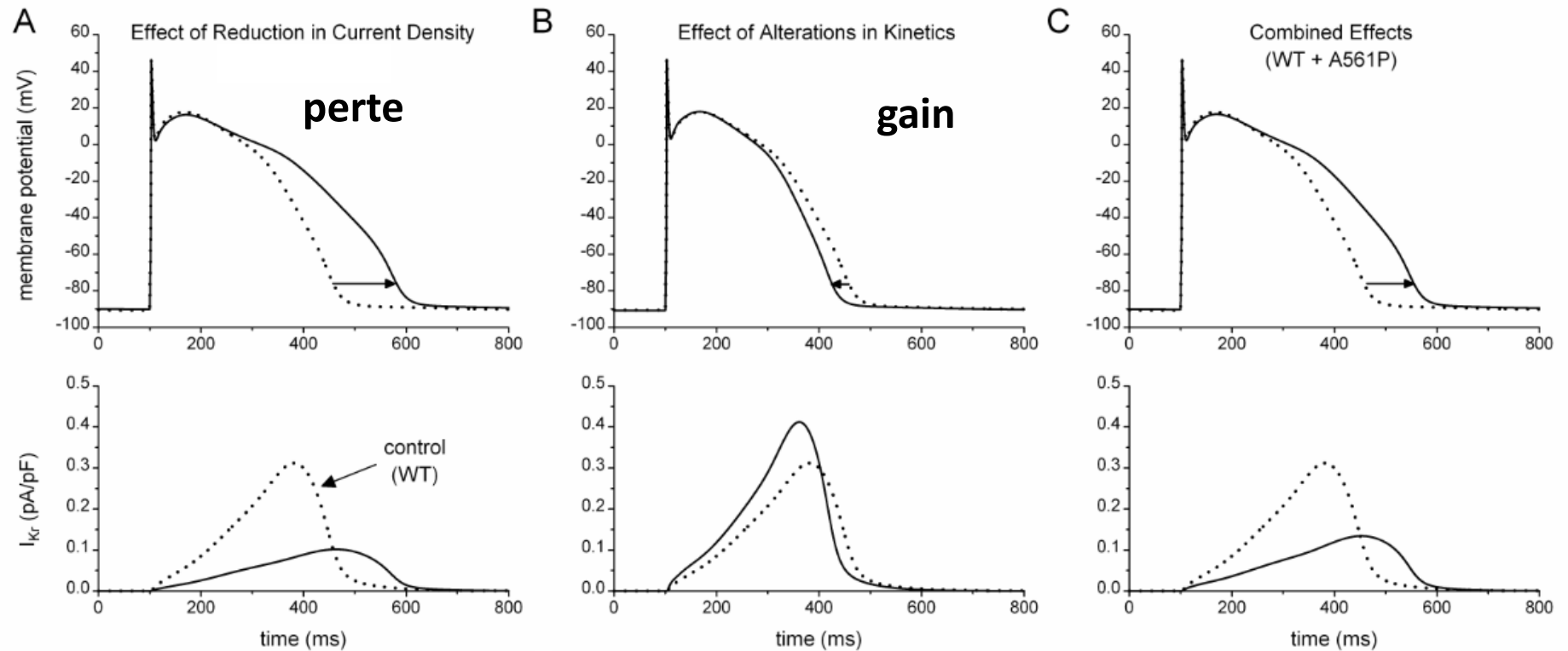
$$\beta_{Xr} = \{0.016 \cdot \exp[1.6 \cdot 10^{-3} \cdot (V + 65.66)]\} /$$

$$\{1 + \exp[0.0783 \cdot (V + 65.66)]\}$$

$$r_{ik} = 1 / \{1 + \exp[(V + 26)/23]\}$$

where $g_{Kr, \max}$ is g_{\max} for I_{Kr} , X_r is the activation gate of I_{Kr} , r_{ik} is the inward-rectification factor of I_{Kr} , and E_K is the equilibrium potential for I_K .

$$\frac{dX_r}{dt} = \alpha_{Xr}(1 - X_r) - \beta_{Xr}X_r = \frac{X_{r\infty} - X_r}{\tau_{Xr}}$$

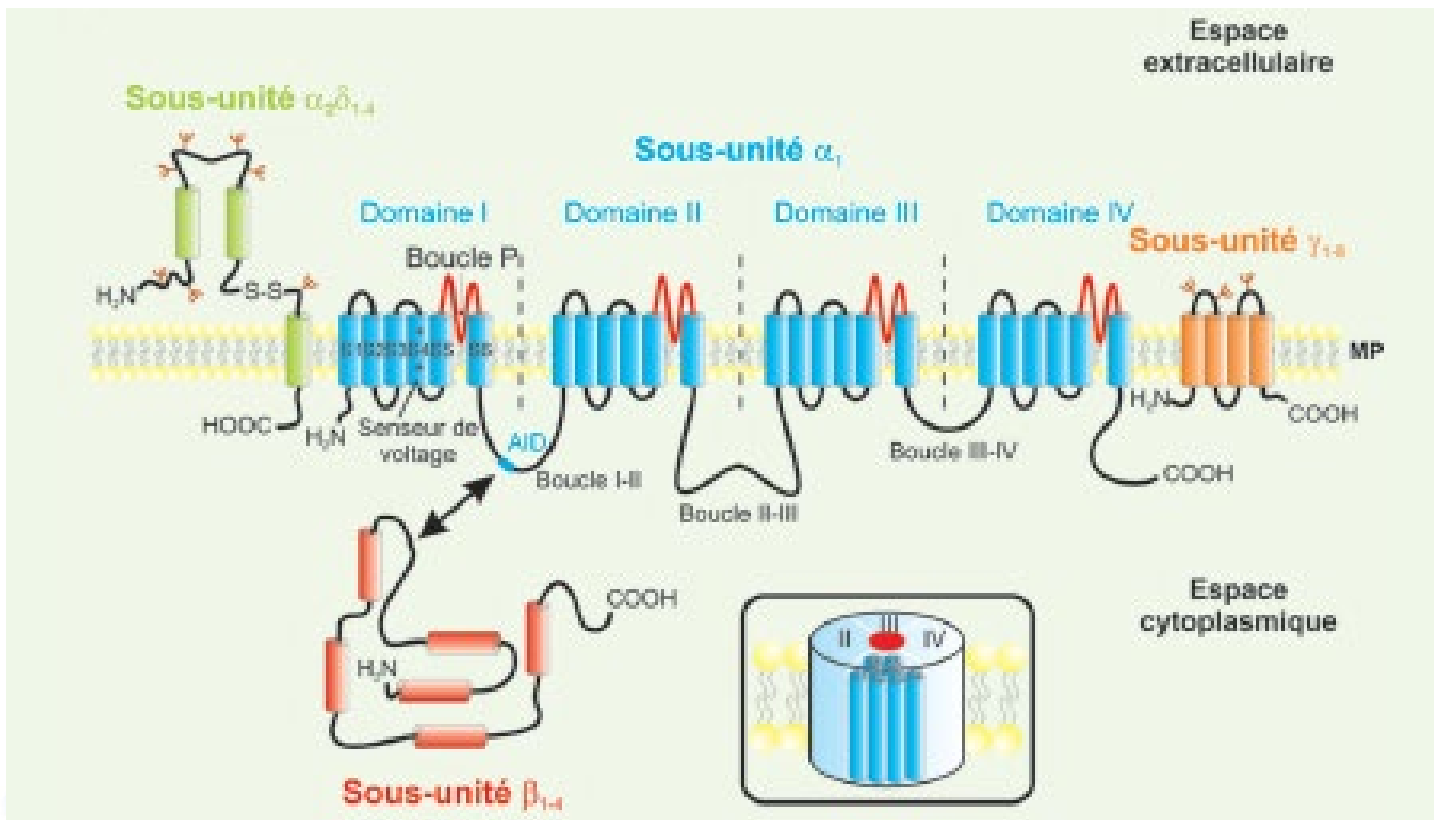
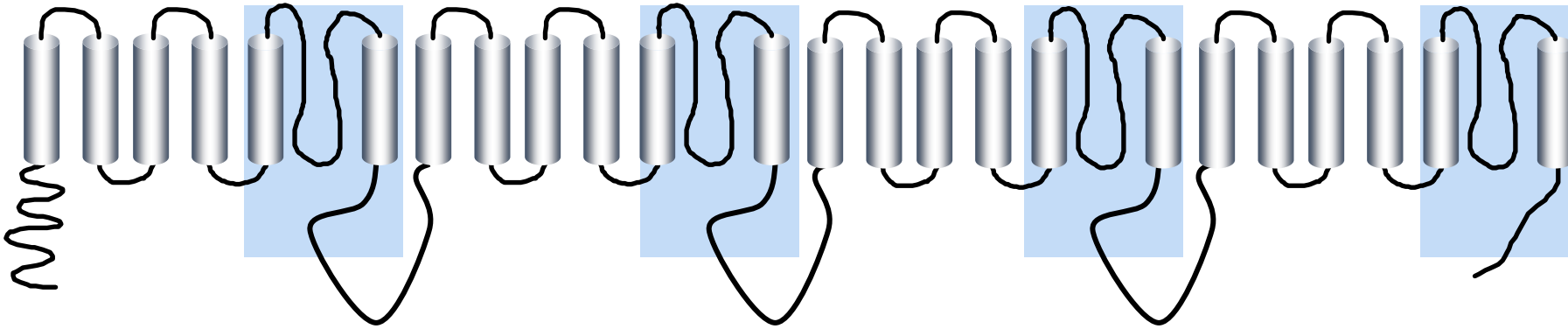


Hodgkin AL, Huxley AF. J Physiol. 1952 Aug;117(4):500-44.

Priebe L, Beuckelmann DJ. Circ Res. 1998 Jun 15;82(11):1206-23.

Belloq C *et al.* Mol Pharmacol. 2004 Nov;66(5):1093-102.

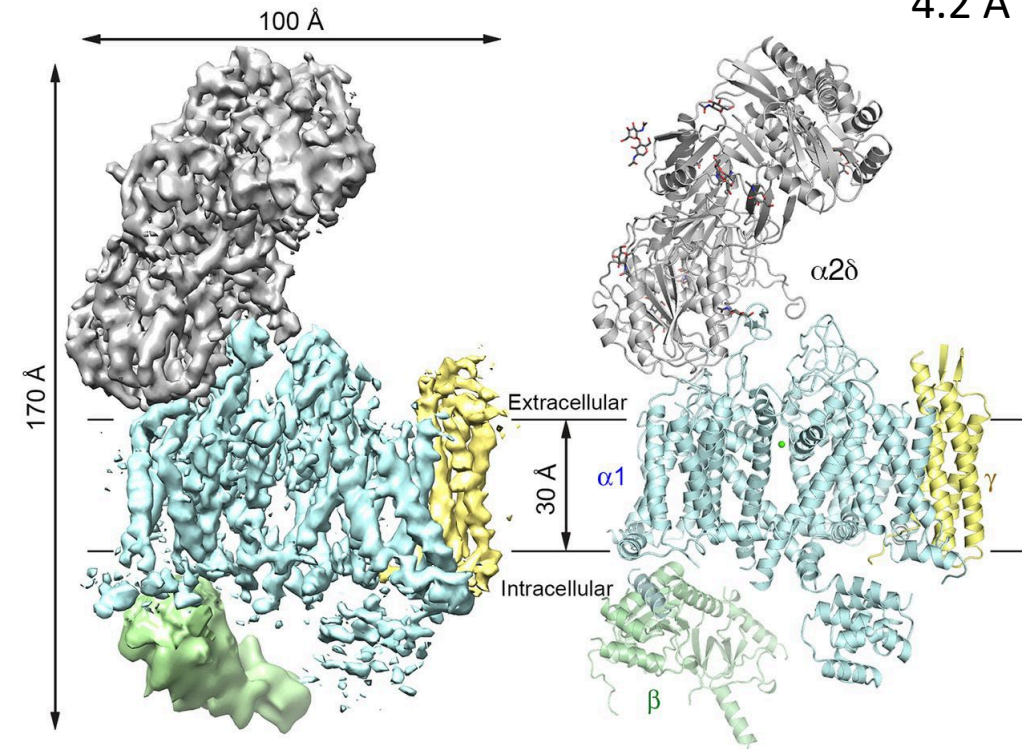
Canaux Ca^{2+} : 4 domaines homologues



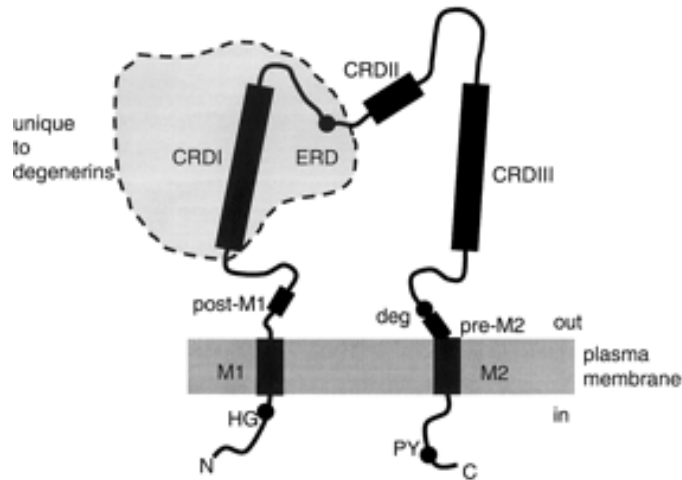
cryo-EM

Cav1.1

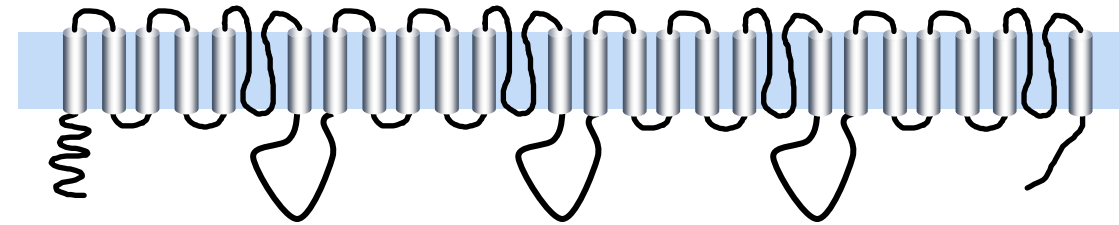
4.2 Å



Canaux Na^+ : 2 classes

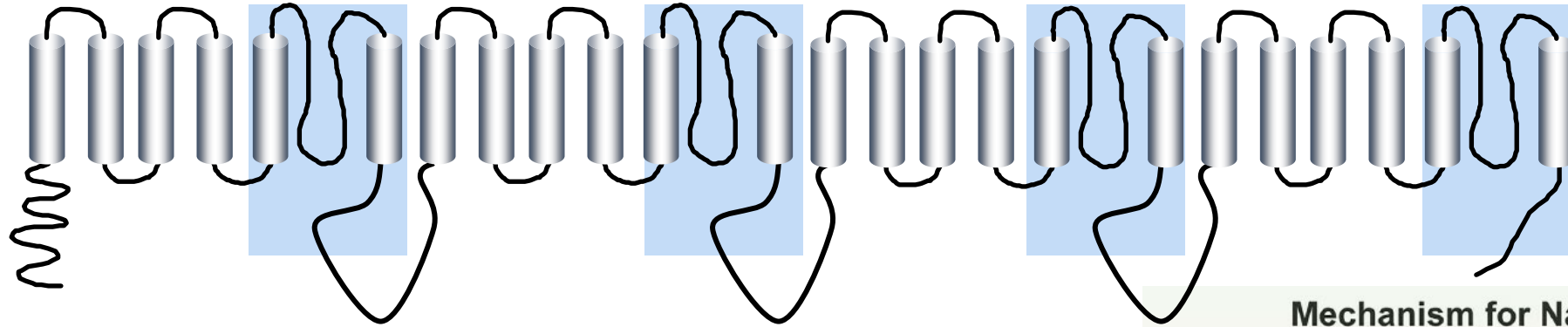


- **ENaC (epith. Na^+ channel)**

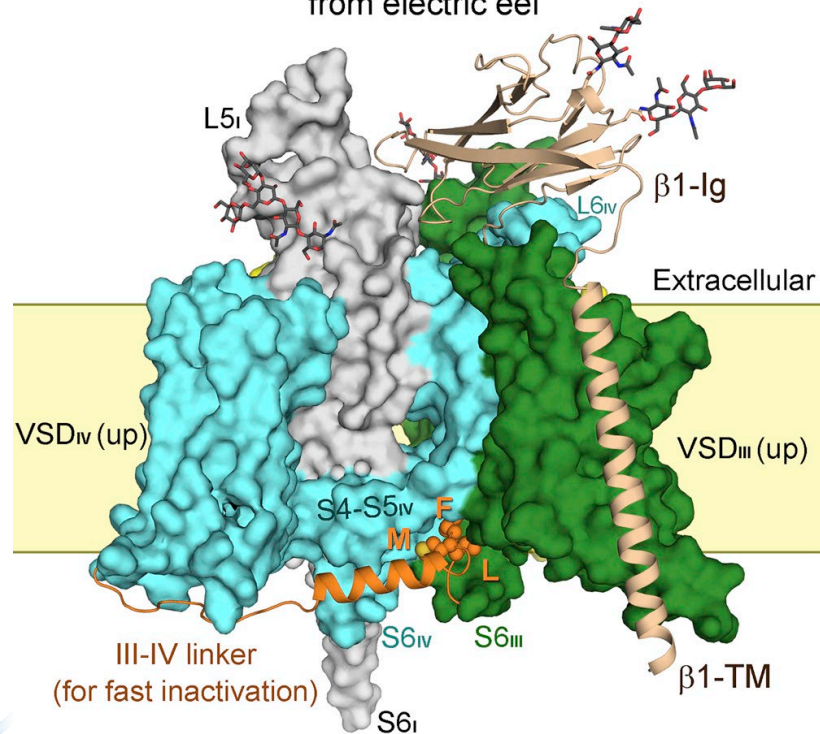


- **Nav: voltage-gated**
- **canal Na^+ cardiaque : Nav1.5 + Nav β 1 (*SCN5A* et *SCN1B*)**

Canaux Nav: structure

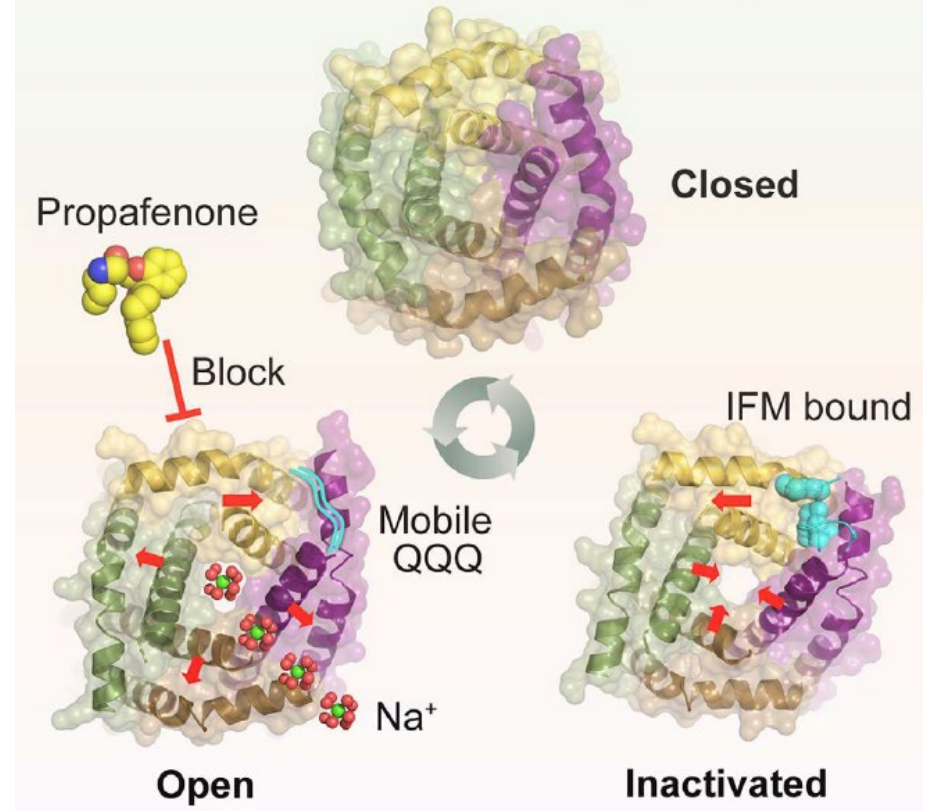


Cryo-EM structure of the Nav1.4- β 1 complex from electric eel



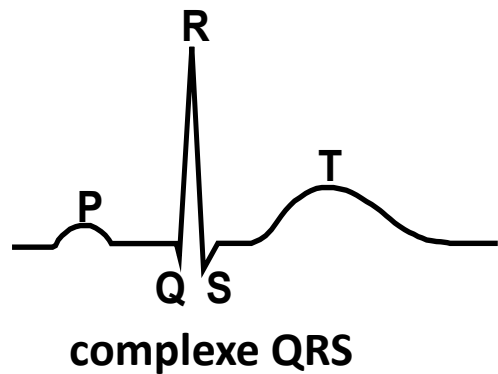
Yan *et al.* Cell. 2017 Jul 27;170(3):470-482.e11.

Mechanism for Nav1.5 Opening

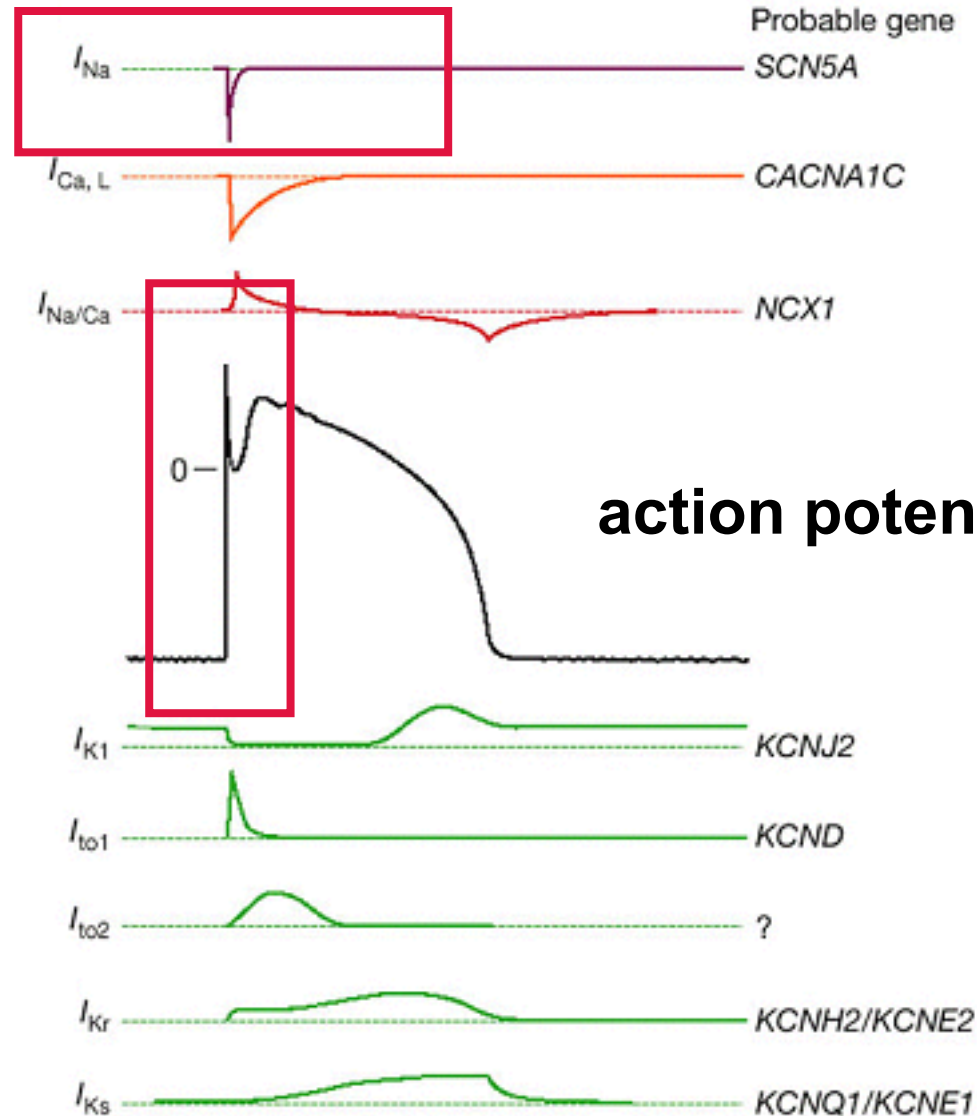


Jiang D *et al.* Cell. 2021 Sep 30;184(20):5151-5162.e11

Activité électrique du cardiomyocyte ventriculaire : le potentiel d'action



canal Nav1.5



early depolarization

plateau

diastolic potential

early repolarization

late repolarization

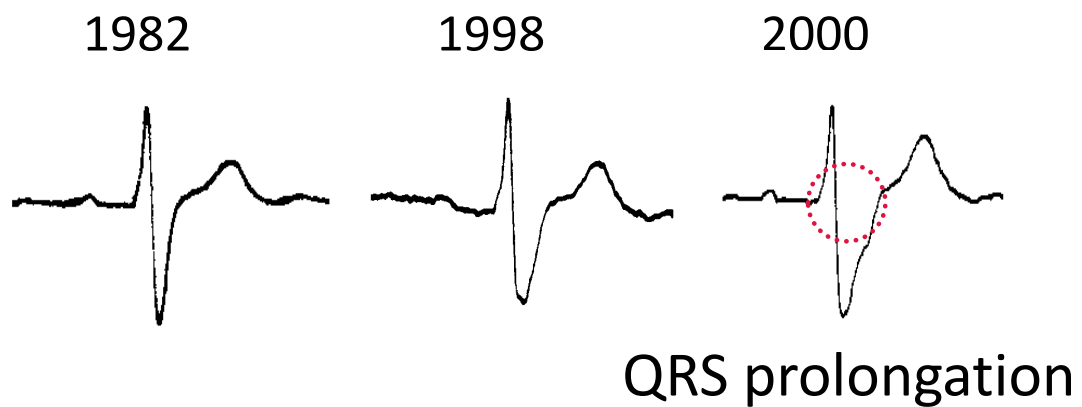
Du modèle cellulaire au modèle murin du syndrome de Lenègre

- Syndrome de Lenègre :
ralentissement de la
conduction cardiaque
héréditaire

→ bloc de conduction

- Modèles cellulaires: lignées cellulaires
modifiées - canalopathies monogéniques

Expression hétérologue de protéines Nav1.5
WT et mutées



Mutation *SCN5A* : canal Nav1.5 Δ exon22 ← causal?

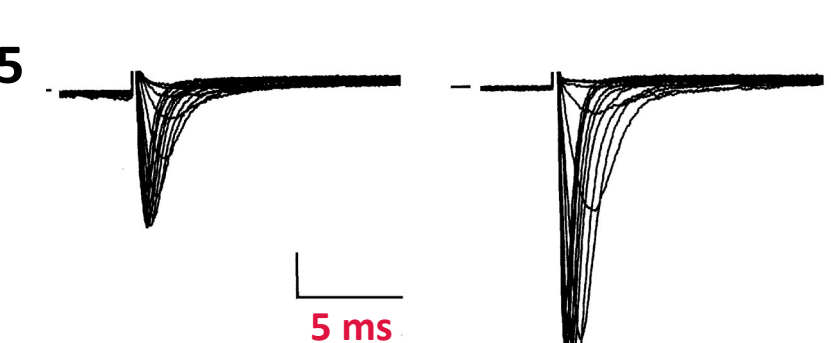
transfected COS-7

$I_{Nav1.5}$

WT

B

WT + h β 1



C

Δ exon22

D

Δ exon22 + h β 1



Schott JJ *et al.* Nat Genet . 1999 Sep;23(1):20-1.

Probst V *et al.* J Am Coll Cardiol. 2003 Feb 19;41(4):643-52.

Du modèle cellulaire au modèle murin du syndrome de Lenègre

1982

1998

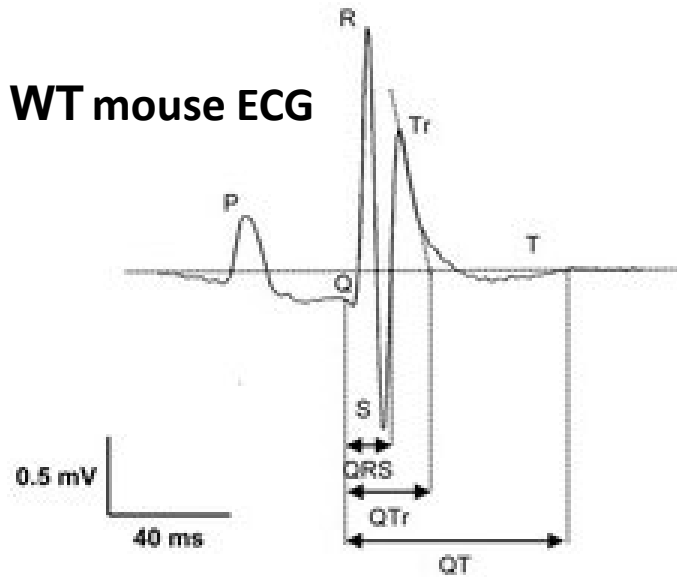
2000

prolongation



SCN5A mut : exon 22 absent

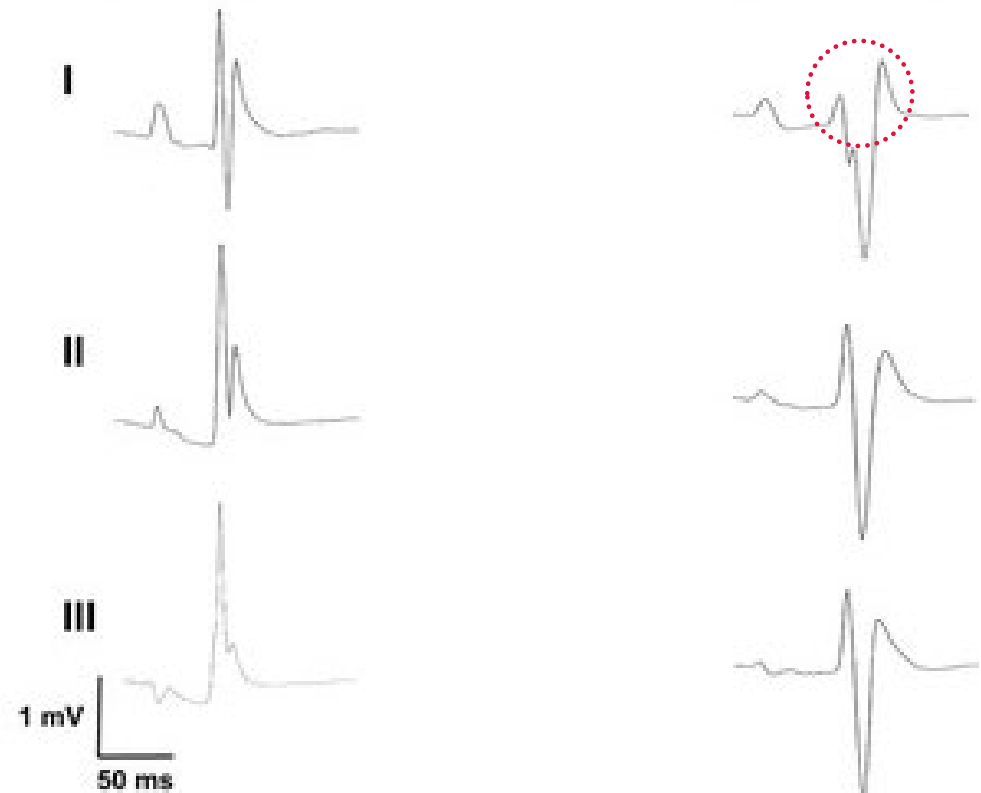
WT mouse ECG



Scn5a^{+/-} mouse

**Z502
(wild-type)**

**Y95
(Scn5a^{+/-})**



Schott JJ *et al.* Nat Genet . 1999 Sep;23(1):20-1.

Probst V *et al.* J Am Coll Cardiol. 2003 Feb

19;41(4):643-52.

Royer *et al.* Circulation. 2005 Apr 12;111(14):1738-46

Haplo-insuffisance de SCN5A → causal

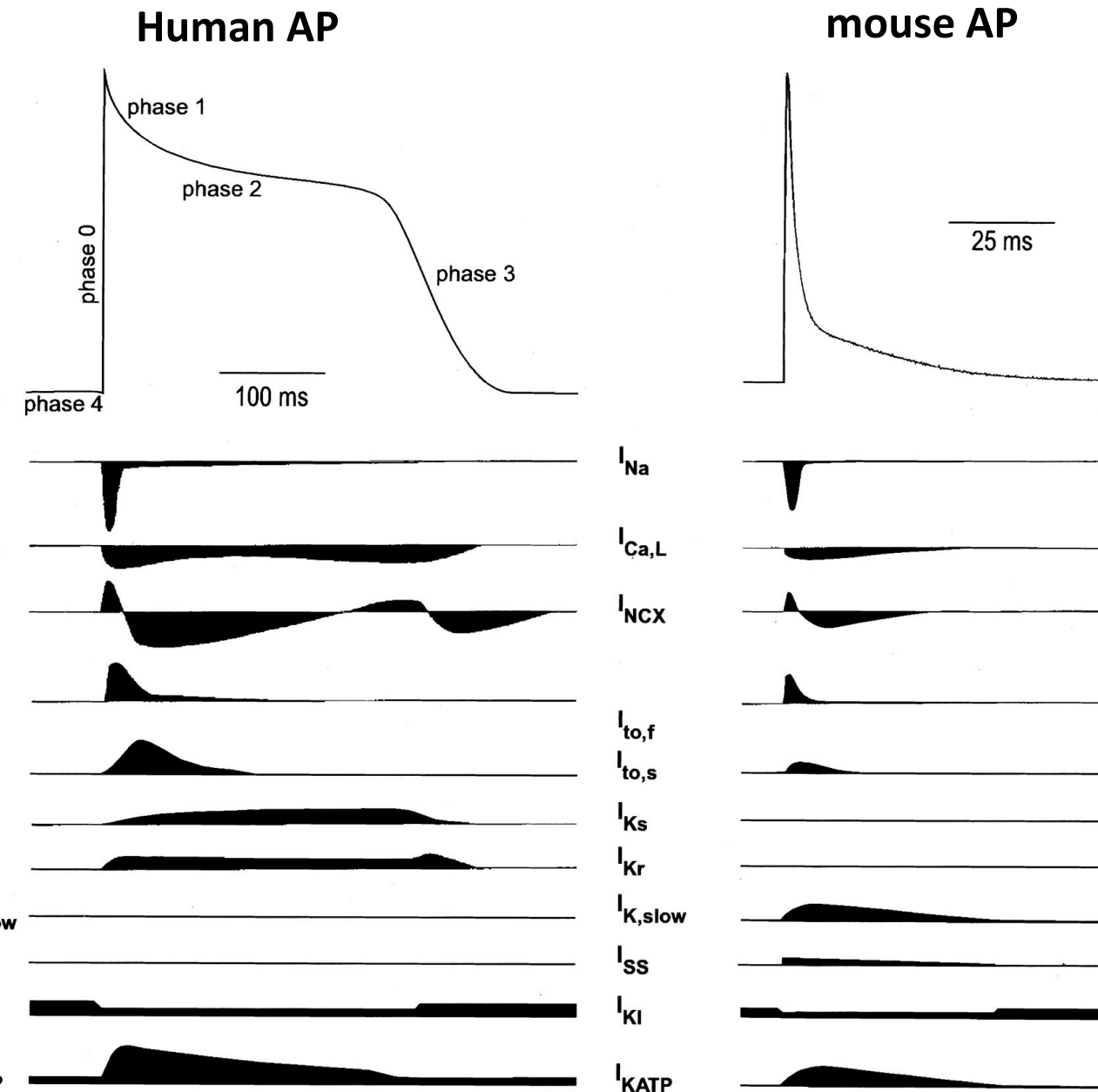
Modèles unicellulaires

- lignées cellulaires :
environnement protéique ?
(complexe canalaire)
- modèles animaux : expression
espèce-spécifique?

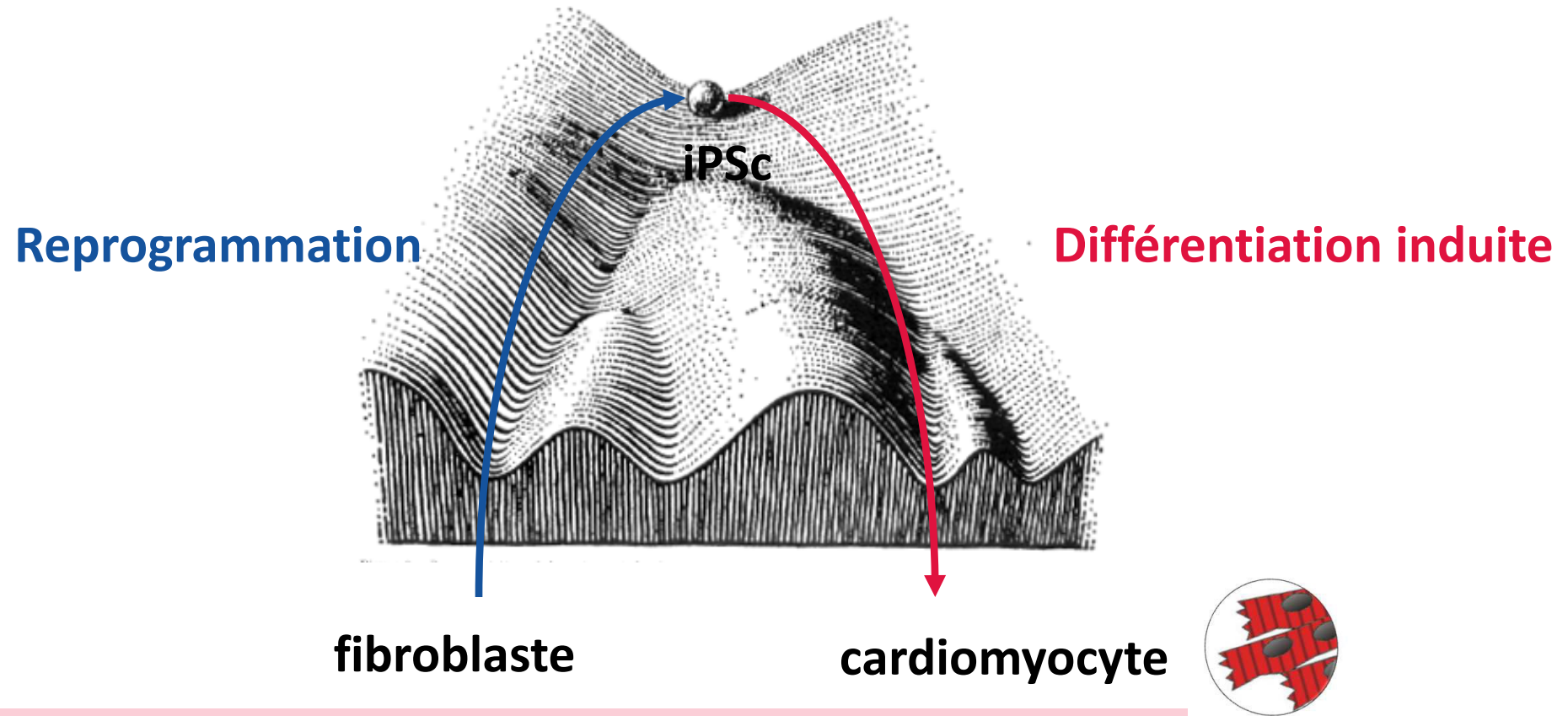
Modèles informatiques

- environnement fonctionnel ?

Limites



Cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS-CM)



Yamanaka S, Gurdon J: Prix Nobel de médecine 2012

"...for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent."

Cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes induites (iPS-CM)

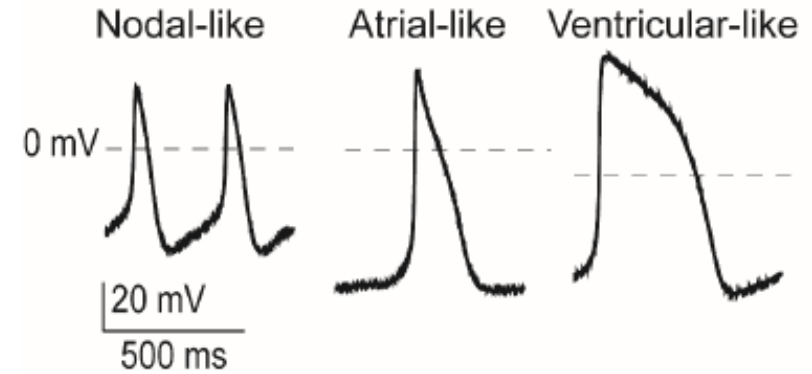
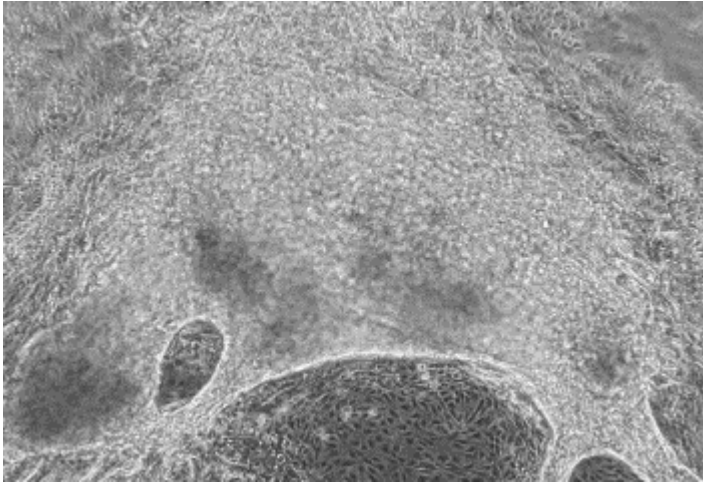
Cellules d'origine :

- peau, sang, urine
- porte le patrimoine génétique du patient (mutations, variants, SNP...)

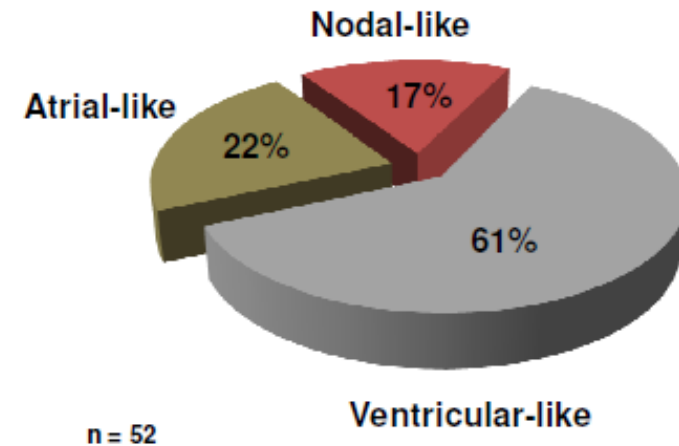
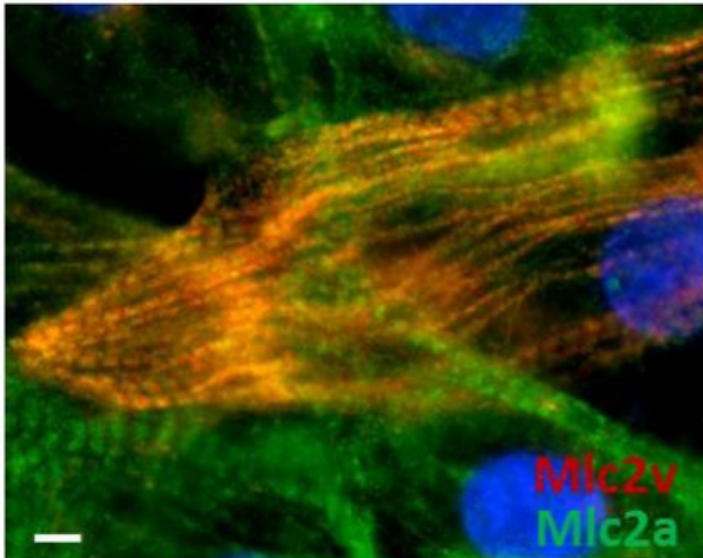
Cardiomyocytes issus d'iPSc

- générés au laboratoire dans des conditions acceptables (éthique, temps et budget)
- environnement génétique humain

hiPS-cardiomyocytes



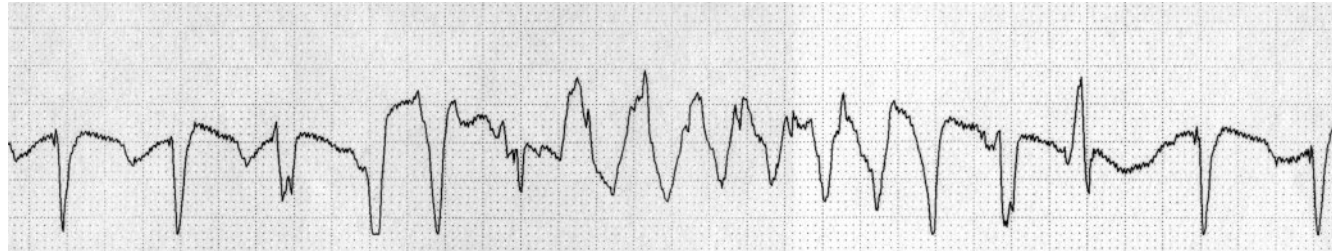
Hétérogénéité phénotypique



Modélisation du syndrome du QT long: A561P HERG

➔ hERG A561P modifie-t-il le potentiel d'action des cardiomyocytes du malade ?

▼ Feb-05-99 – clobutinol



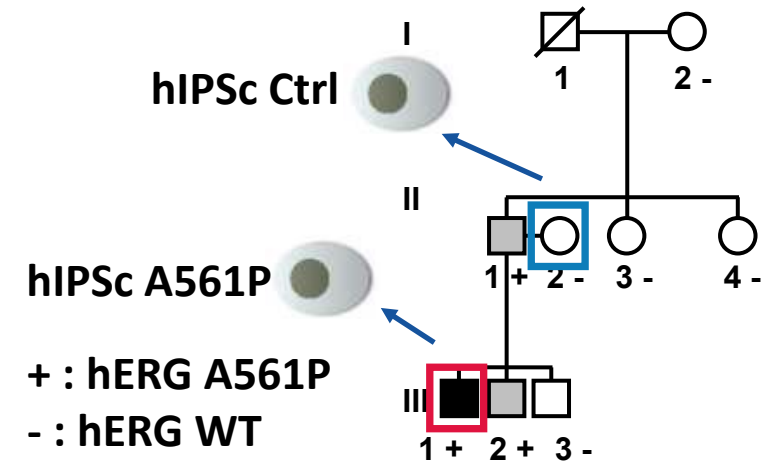
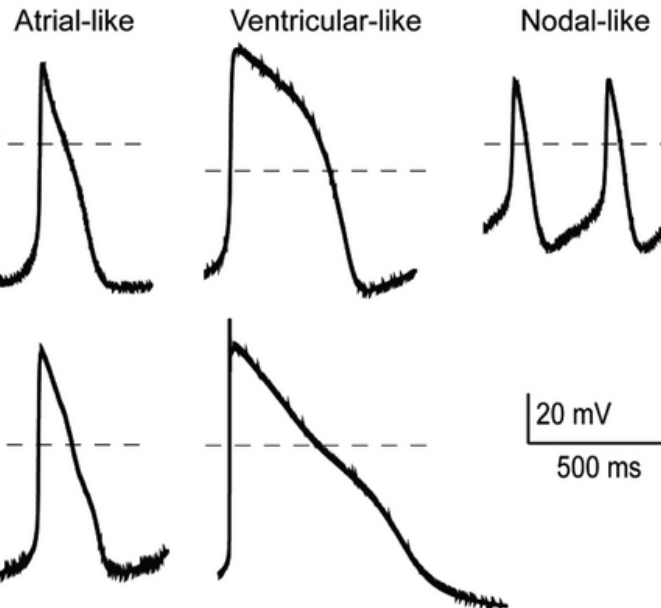
• re-programmation

urinary cells

hiPSc

hiPS-CM

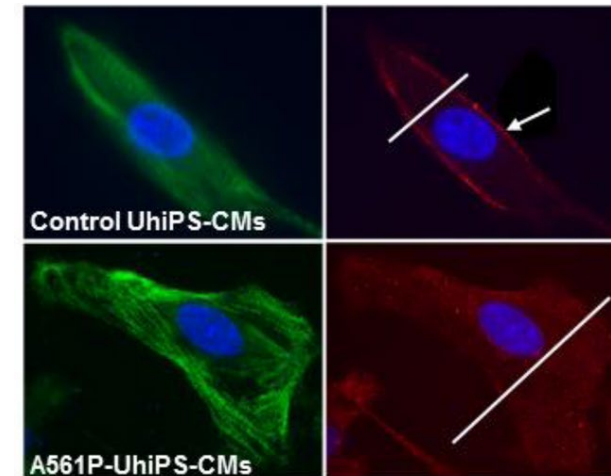
• current-clamp



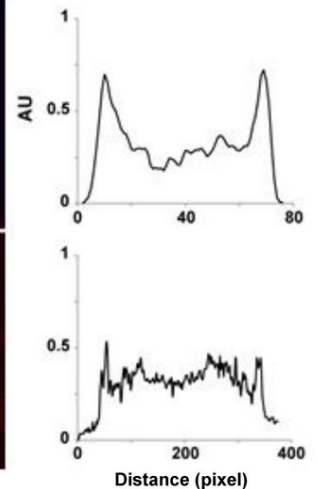
• immuno-cytofluorimétrie

troponin I

hERG



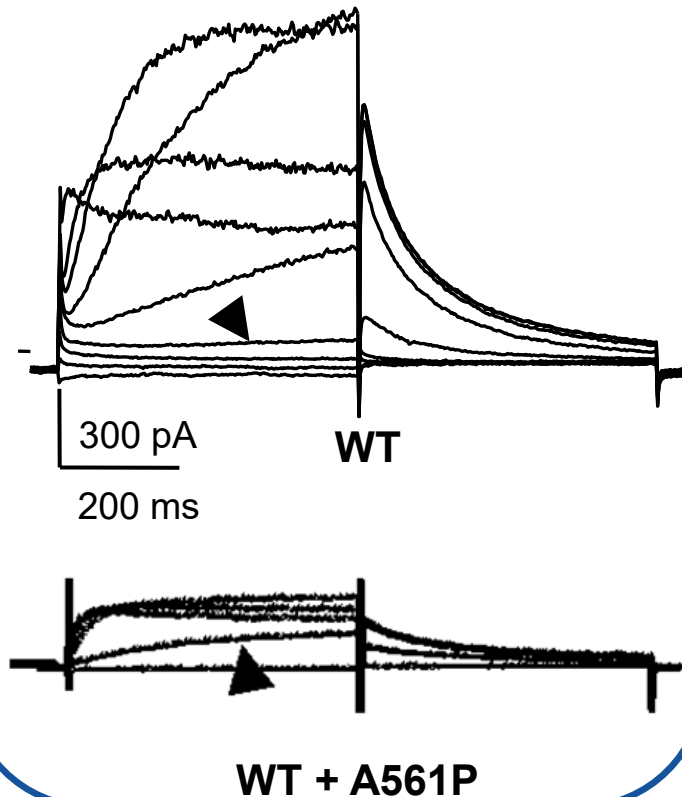
DAPI



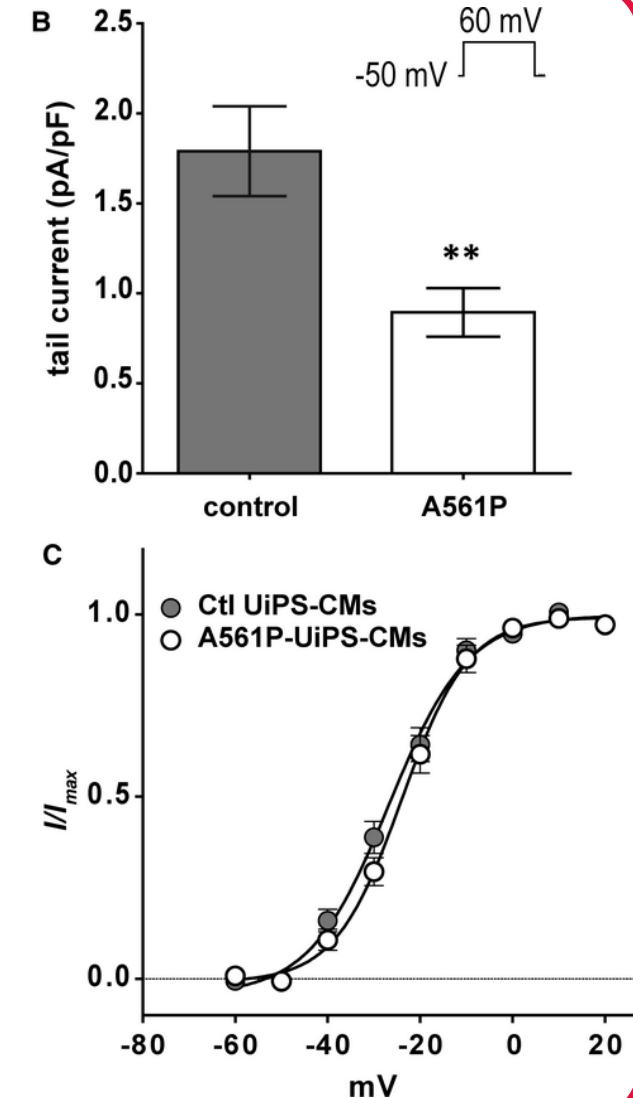
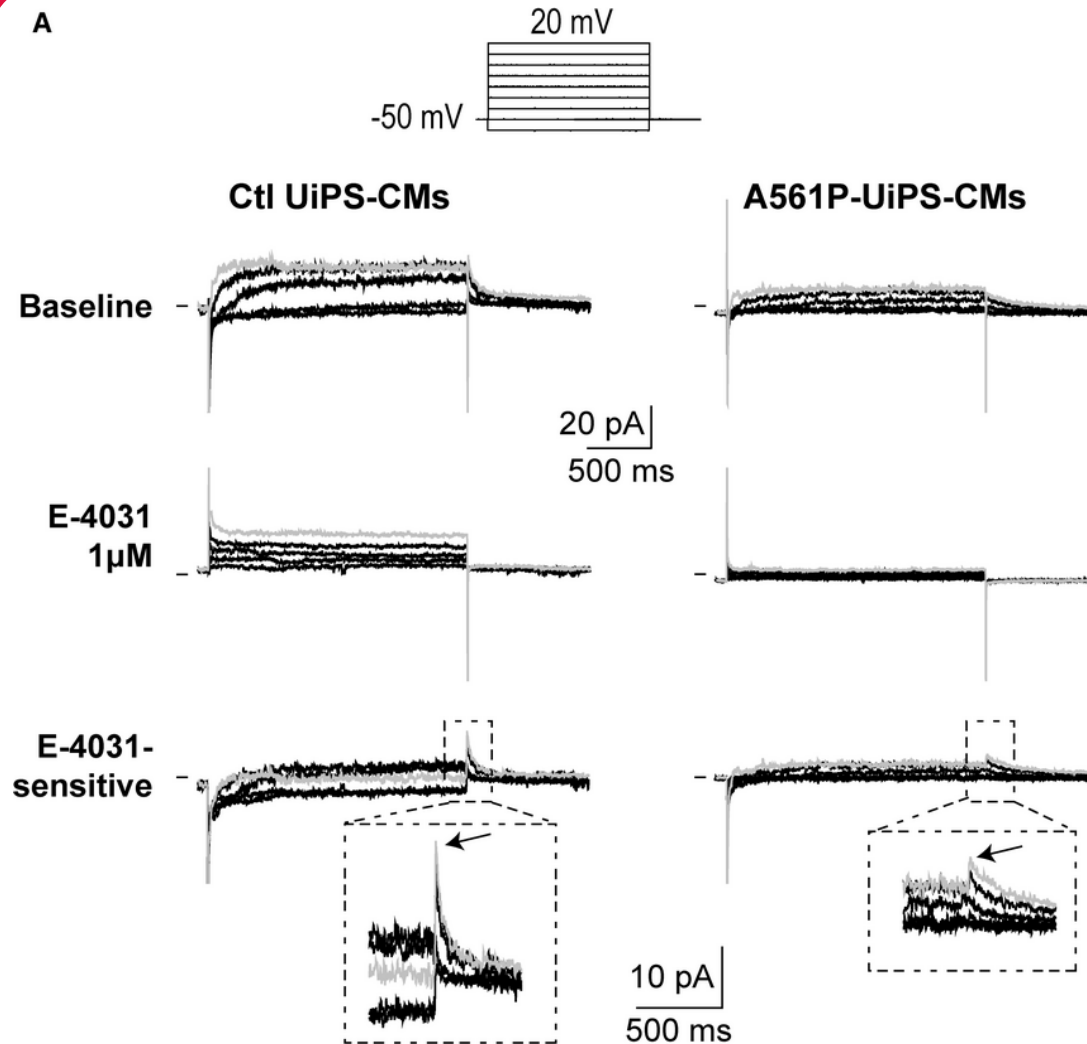
Transfected cells vs hiPS-cardiomyocytes

- voltage-clamp

transfected COS-7 cells

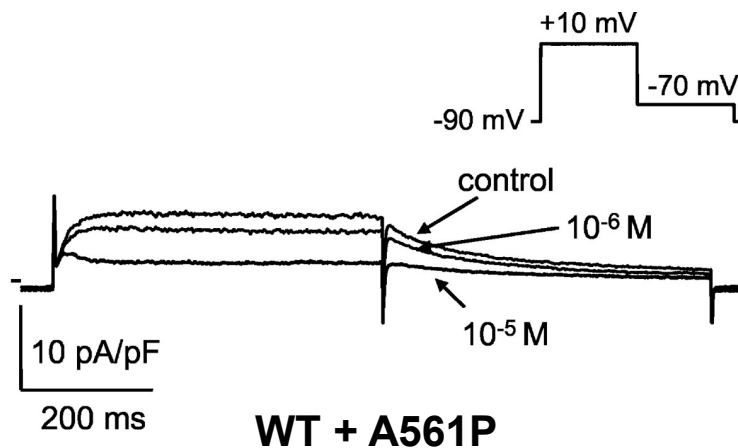
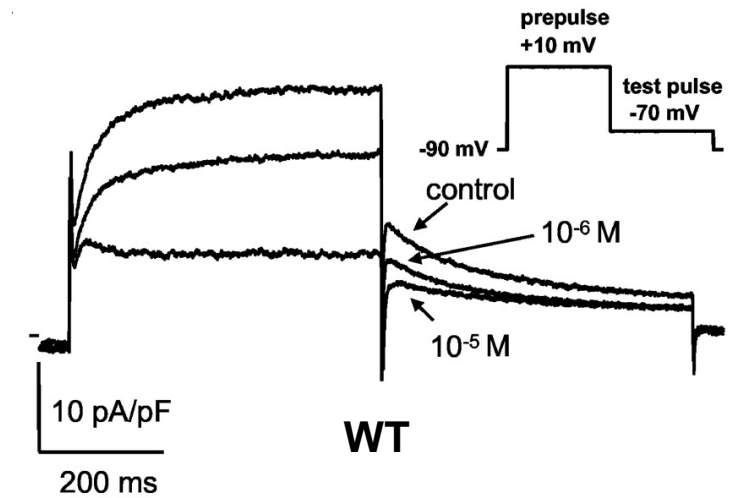


Bellocq C *et al.* Mol Pharmacol.
2004 Nov;66(5):1093-102



Transfected cells vs hiPS-cardiomyocytes

+ clobutinol (I_{Kr} inhib.)

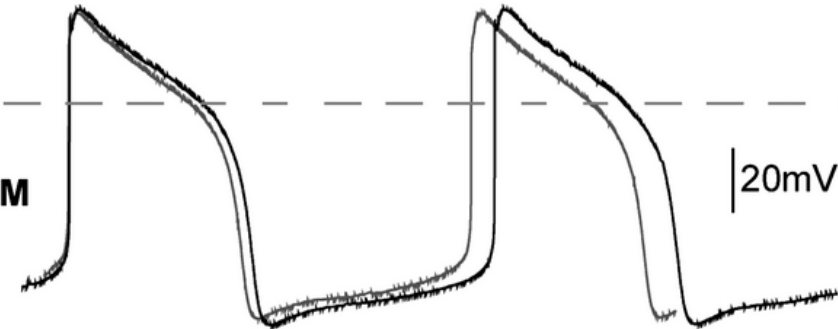


Belloq C *et al.* Mol Pharmacol. 2004 Nov;66(5):1093-102

+ E4031 (I_{Kr} inhib.)

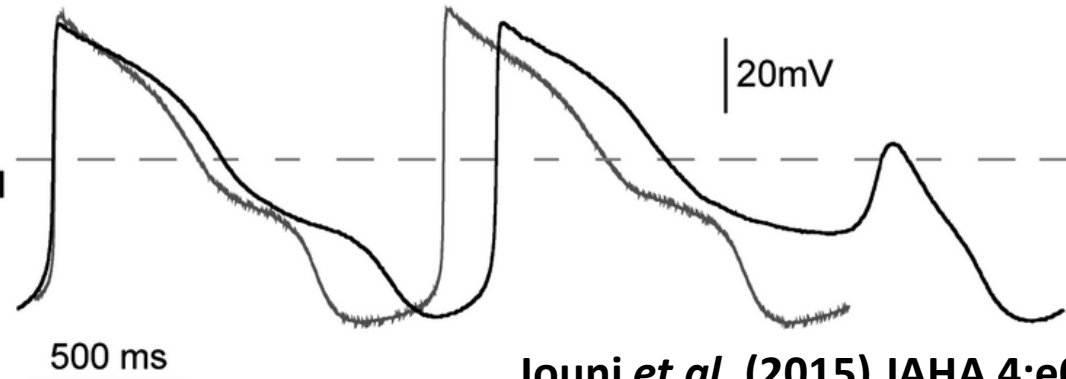
C Control UhiPS-CM

Baseline
+E-4031 1 μ M



A561P-UhiPS-CM

Baseline
+E-4031 1 μ M



Jouni *et al.* (2015) JAHA 4:e002159

- ✓ Défaut de transport
- ✓ Réduction d' I_{Kr}

- Prolongation durée du PA
- Evènements arythmiques

Perte de fonction et allongement confirmés ➔ causal

Analyse d'article



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

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



Original Article

HIV-Tat induces a decrease in I_{K_r} and I_{K_s} *via* reduction in phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate availability



Zeineb Es-Salah-Lamoureux ^{a,1}, Mariam Jouni ^{a,1}, Olfat A. Malak ^a, Nadjat Belbachir ^a, Zeina Reda Al Sayed ^a, Marine Gandon-Renard ^a, Guillaume Lamirault ^b, Chantal Gauthier ^a, Isabelle Baró ^a, Flavien Charpentier ^b, Kazem Zibara ^c, Patricia Lemarchand ^b, Bruno Beaumelle ^d, Nathalie Gaborit ^{a,*,1}, Gildas Loussouarn ^{a,1}

^a l'institut du thorax, Inserm, CNRS, Université de Nantes, Nantes, France

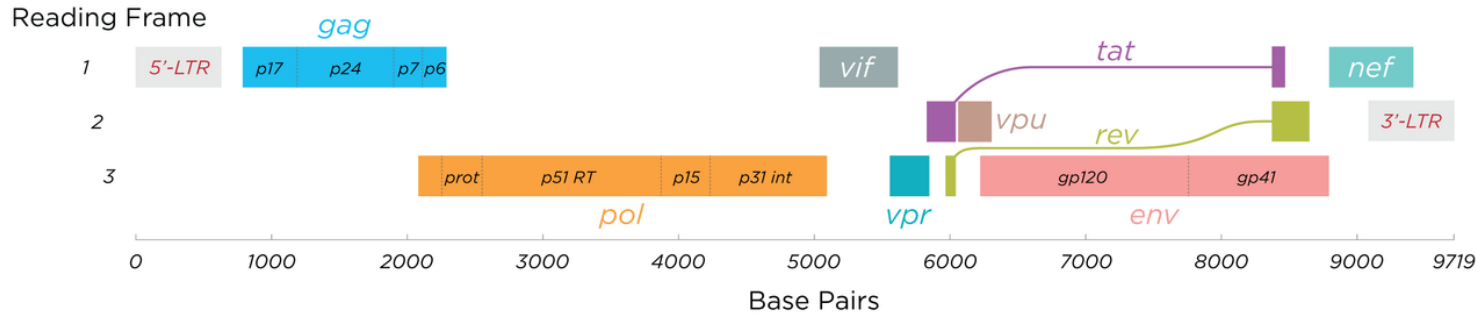
^b l'institut du thorax, Inserm, CNRS, Université de Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

^c ERO45, PRASE, Laboratory of stem cells, Lebanese university, Beirut, Lebanon

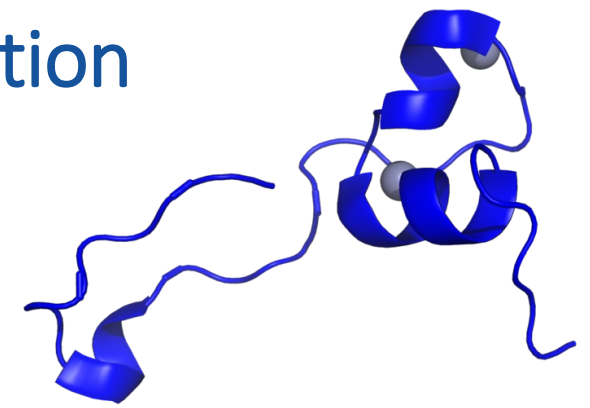
^d Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

- Les patients HIV+ présentent un intervalle QT allongé et un risque de mort subite élevé par rapport à la population générale. Origine ?
- Des études précédentes suggèrent un effet direct du virus (plus que des anti-viraux)

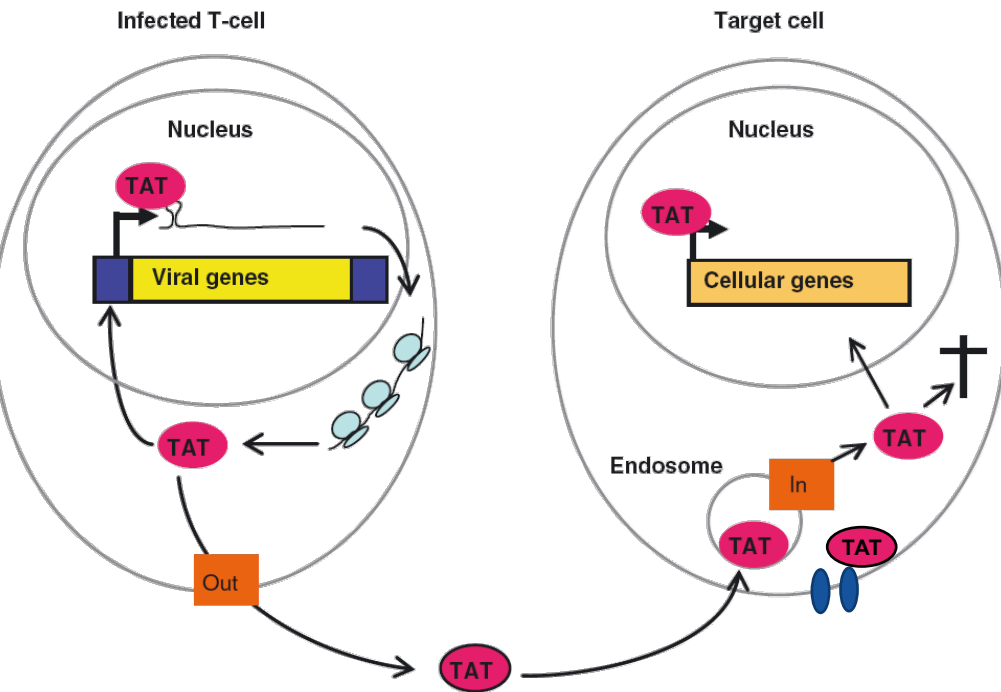
Tat = Trans-Activator of Transcription



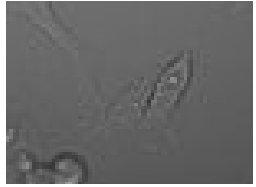
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=33943759>



<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=79119847>



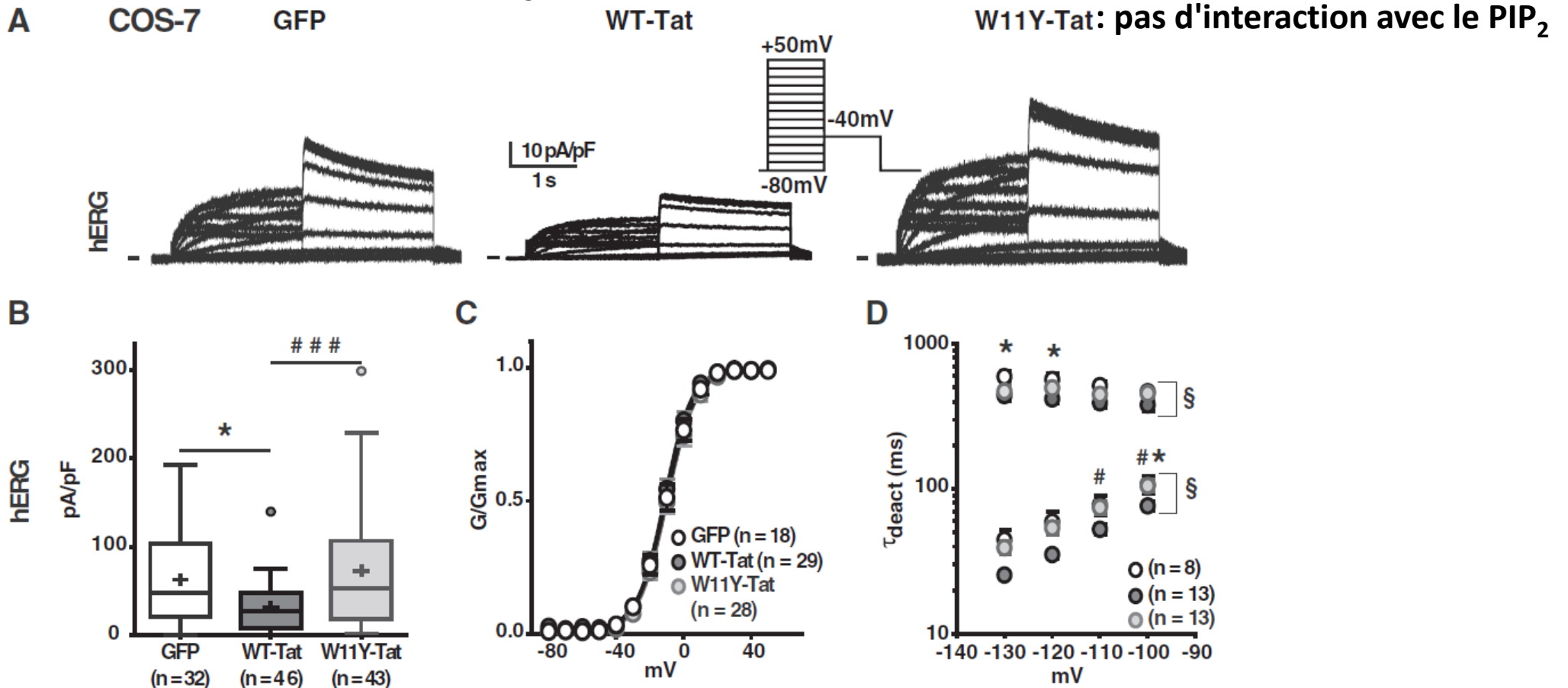
- Protéine Tat du HIV-1 : présente dans le sérum des patients, peut pénétrer les cellules et interagir avec le PIP_2 (phosphoinositide).
 - KCNQ1 et hERG, canaux repolarisants, nécessitent du PIP_2 pour être fonctionnels
- ➔ Les canaux KCNQ1 ou hERG sont-ils impliqués dans les effets cardiaques de l'infection HIV par l'intermédiaire de Tat?



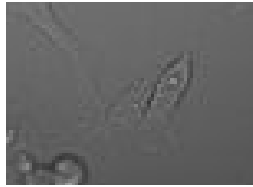
cellules
COS-7

Condition : sur-expression du canal hERG et de la protéine Tat
(WT et mutée) après transfection (plasmides)

- Courant I_{hERG}



- WT-Tat : 1A & B : diminution du courant hERG (et KCNQ1)
- WT-Tat : 1D : accélération de la désactivation du courant hERG (et KCNQ1)
- W11Y-Tat, qui n'interagit pas avec le PIP_2 : pas d'effet

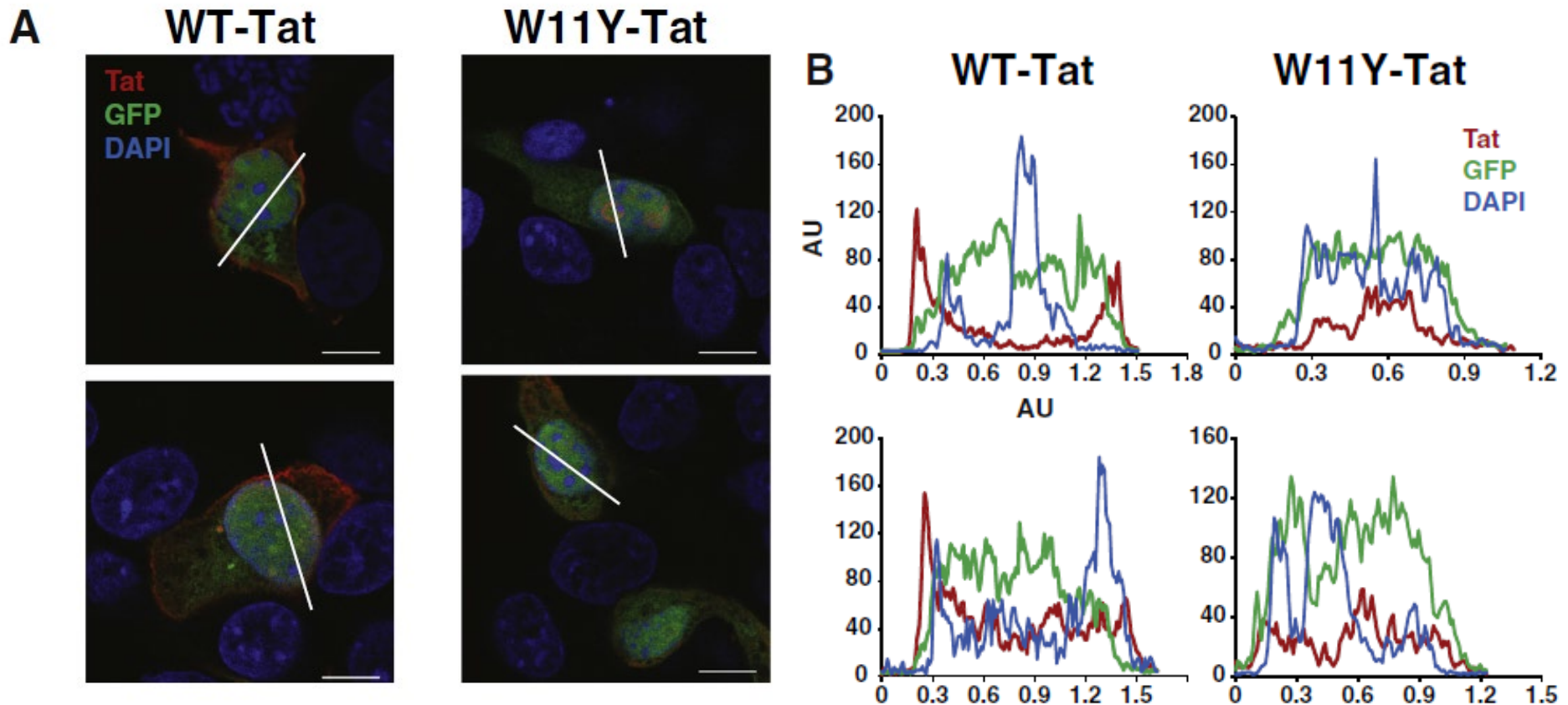


cellules
COS-7

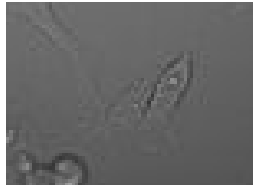
Condition : sur-expression du canal hERG et de la protéine Tat (WT et mutée) après transfection (plasmides)

- Localisation de la protéine Tat (immunomarquage et microscopie confocale)

Figure 3



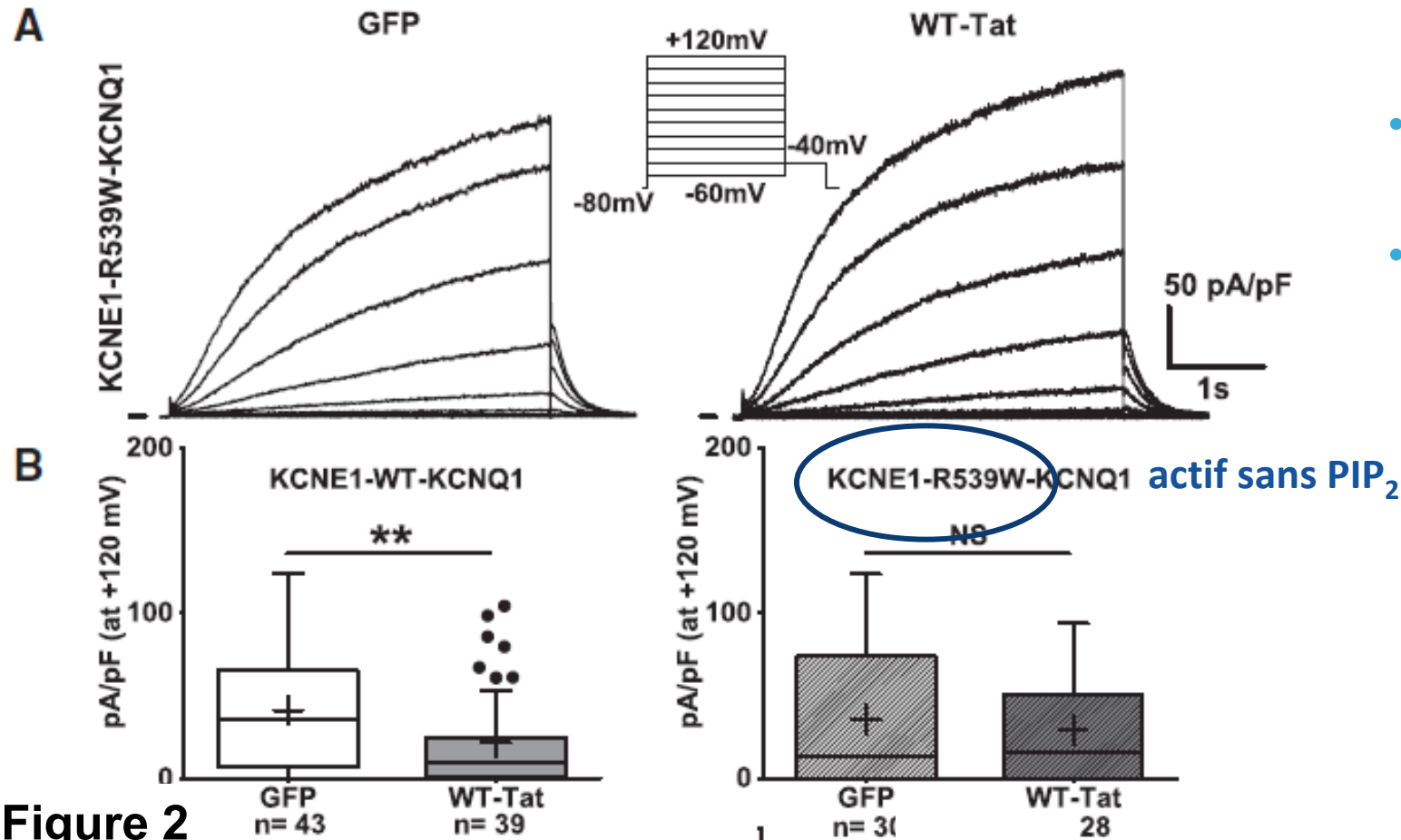
- WT-Tat : membranaire, comme le canal
- W11Y-Tat : non membranaire, car elle n'interagit pas avec le PIP_2



cellules
COS-7

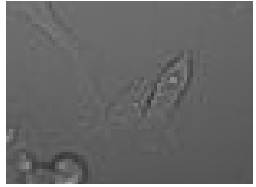
Condition : **sur-expression du canal KCNE1-KCNQ1 (WT et muté) et de la protéine WT-Tat** après transfection (plasmides)

- Courant $I_{\text{KCNE1-KCNQ1}}$



- 3B: canal WT sensible au PIP_2 : sensible à la Tat
- 3A & B canal insensible au PIP_2 : insensible à la Tat

Figure 2

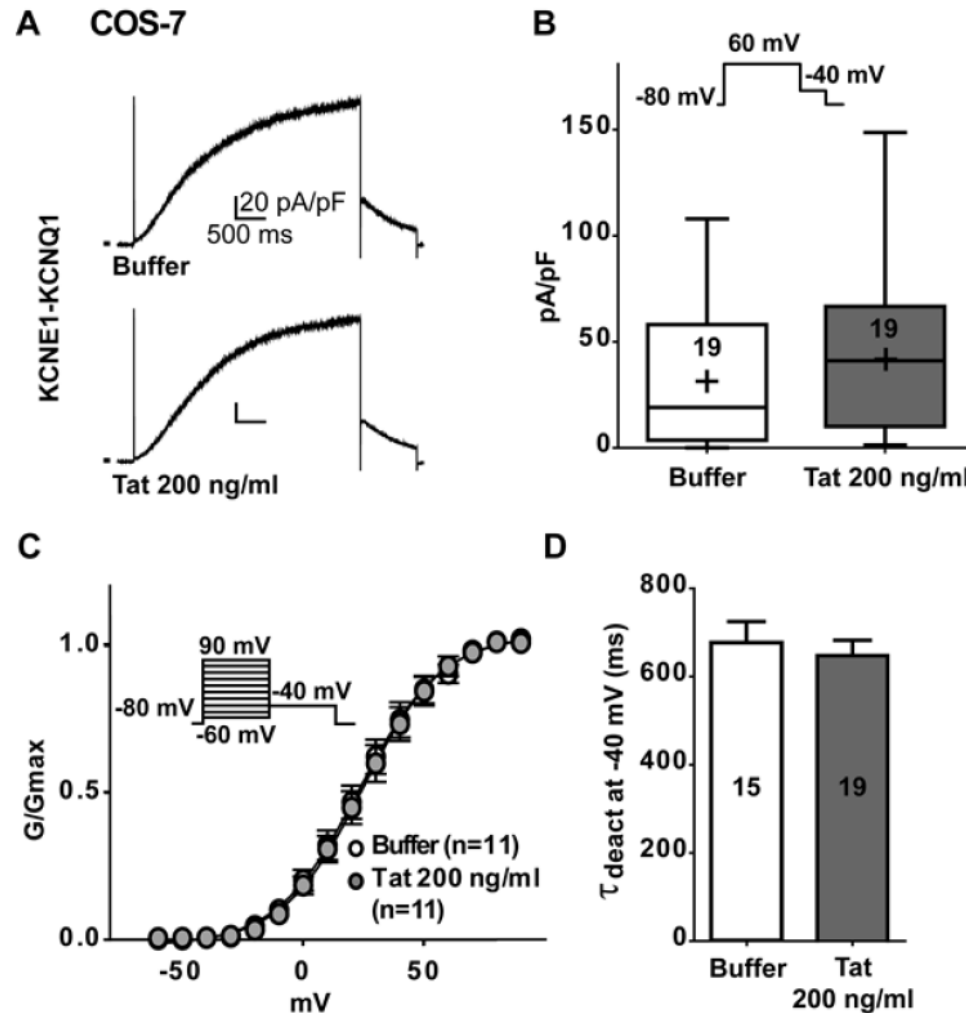


cellules
COS-7

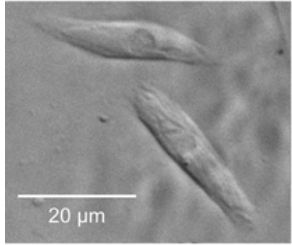
Condition : sur-expression du canal KCNE1-WT- KCNQ1 après transfection (plasmides), **application extracellulaire de la protéine Tat**

- Courant $I_{\text{KCNE1-KCNQ1}}$

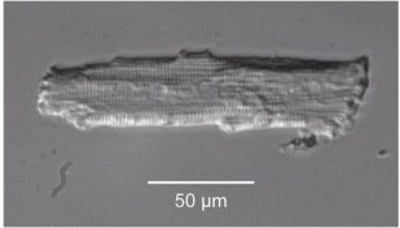
Suppl.
Figure 4



- application de la protéine Tat : pas d'effet



cardiomyocytes
issus de cellules hiPS



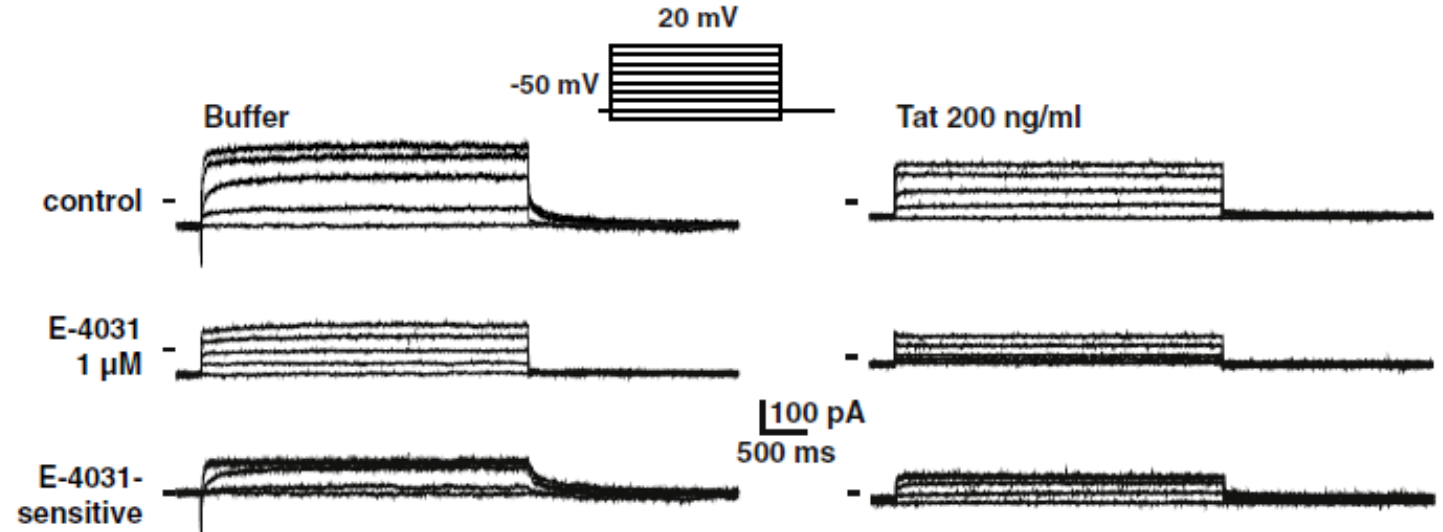
cardiomyocytes humains
fraichement isolés

- application de la protéine Tat : effet sur le courant E-4031-sensible, I_{Kr}

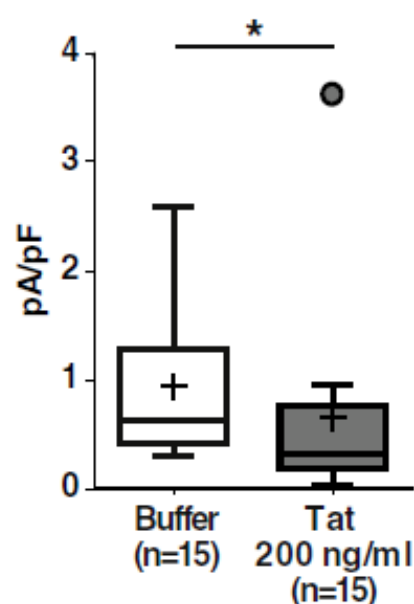
Condition : application extracellulaire de la protéine Tat

- Courant I_{Kr} (hERG, inhibé par E-4031)

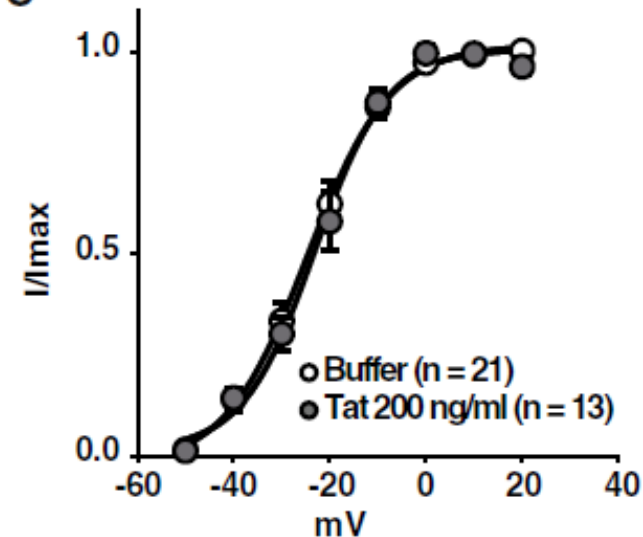
A hiPS-CMs



B



C



D

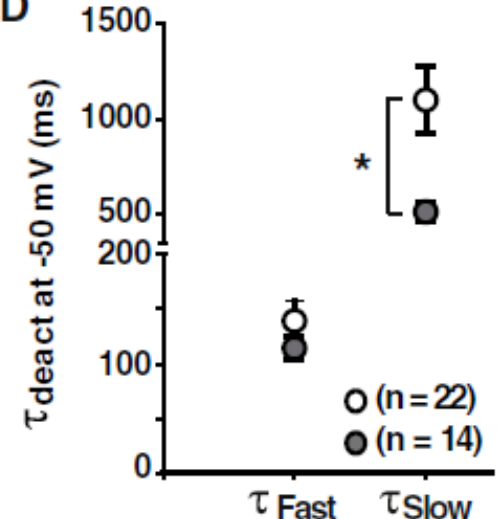
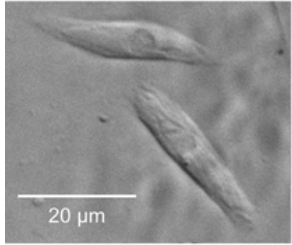


Figure 4



cardiomyocytes
issus de cellules hiPS

Condition : application extracellulaire de la protéine Tat

- expression de hERG ARNm et protéine

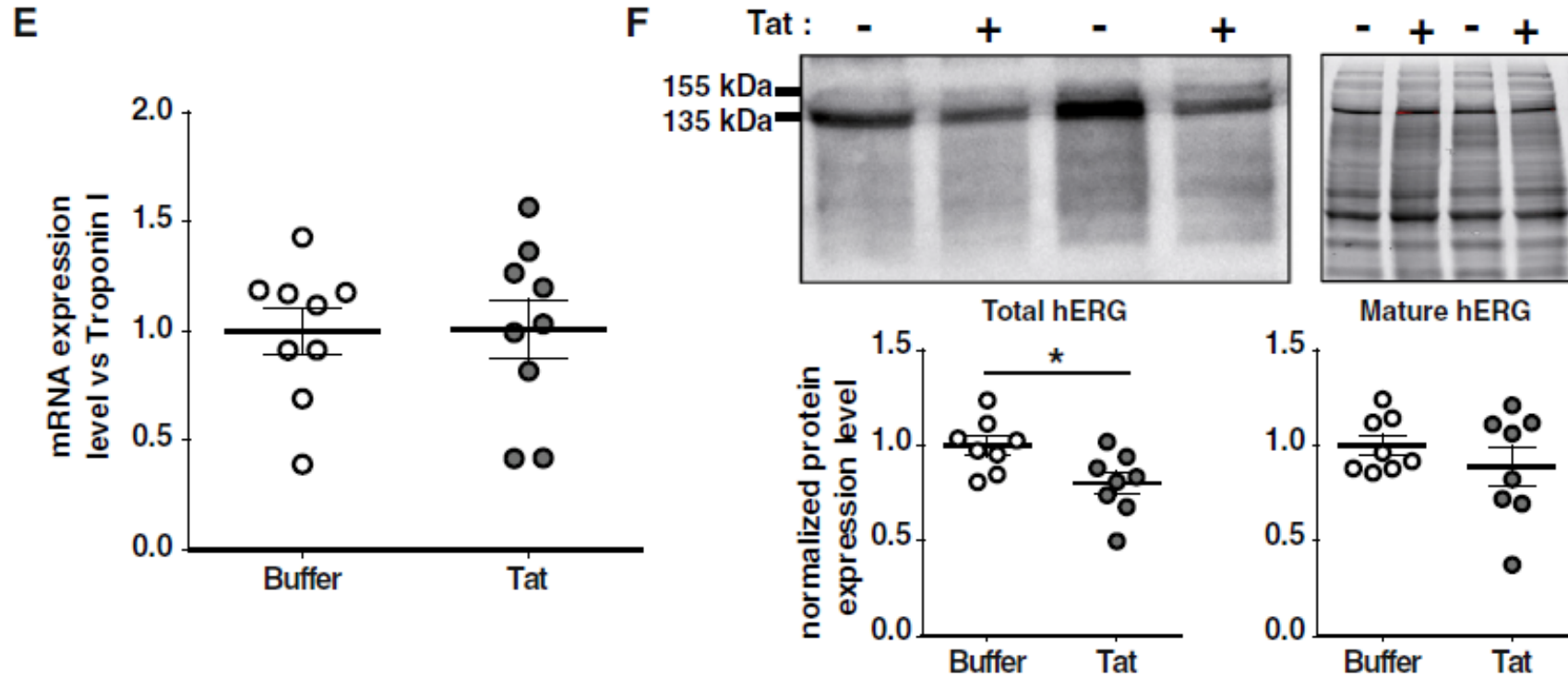


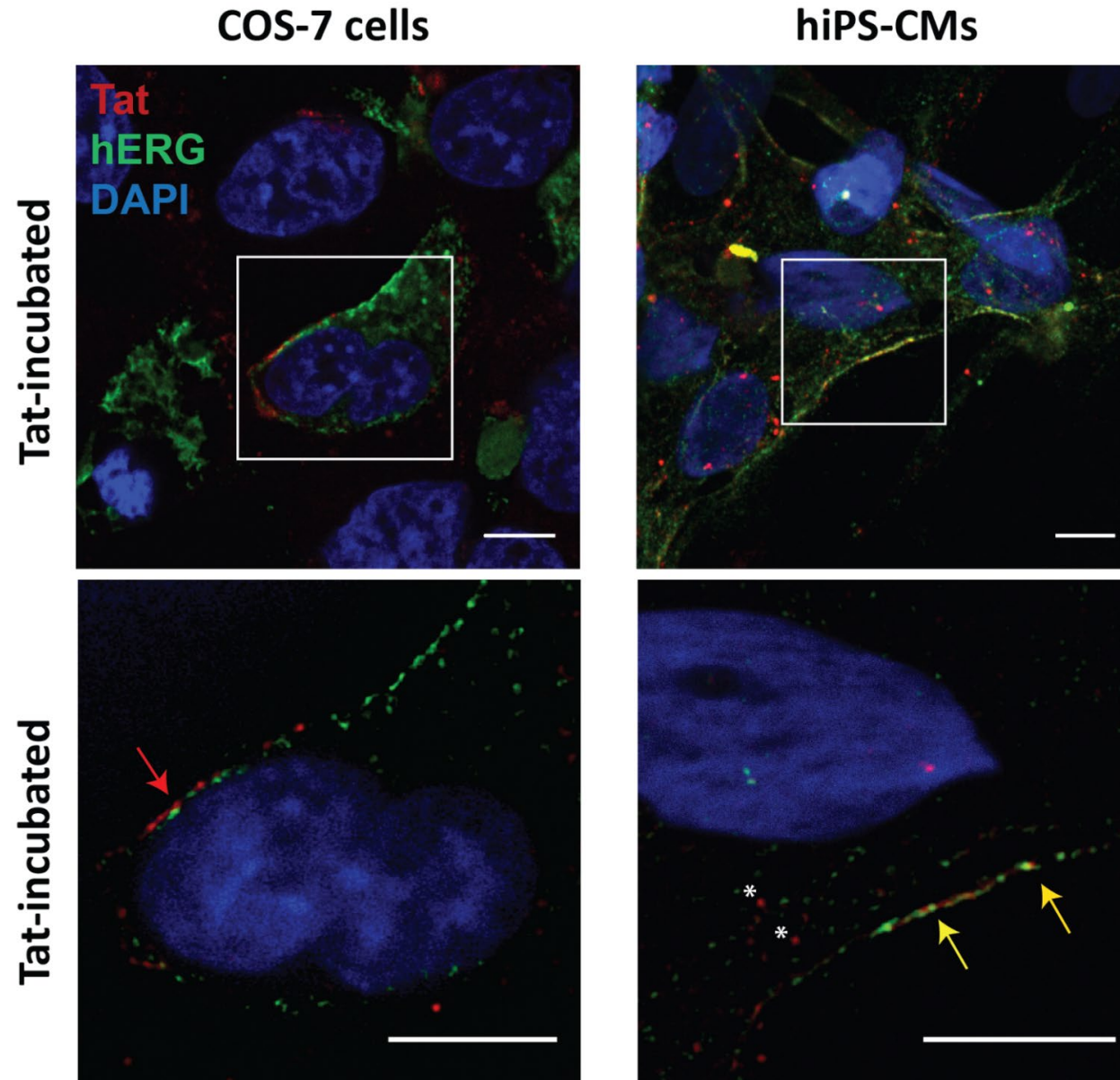
Figure 4

- protéine Tat : pas d'effet sur la densité de canaux à la membrane plasmique
- diminution du courant I_{Kr} par régulation de la fonction

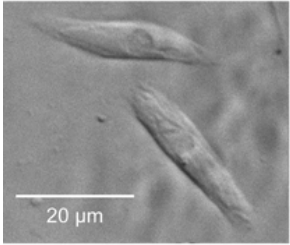
Condition : **application extracellulaire de la protéine Tat**

- Localisation de la protéine Tat (immunomarquage et microscopie confocale)

Figure 5



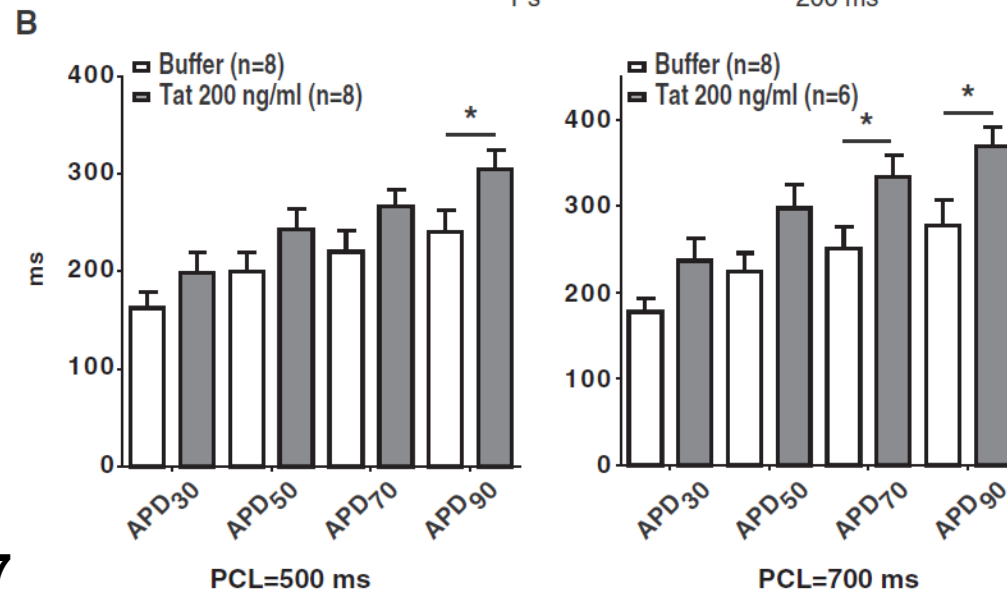
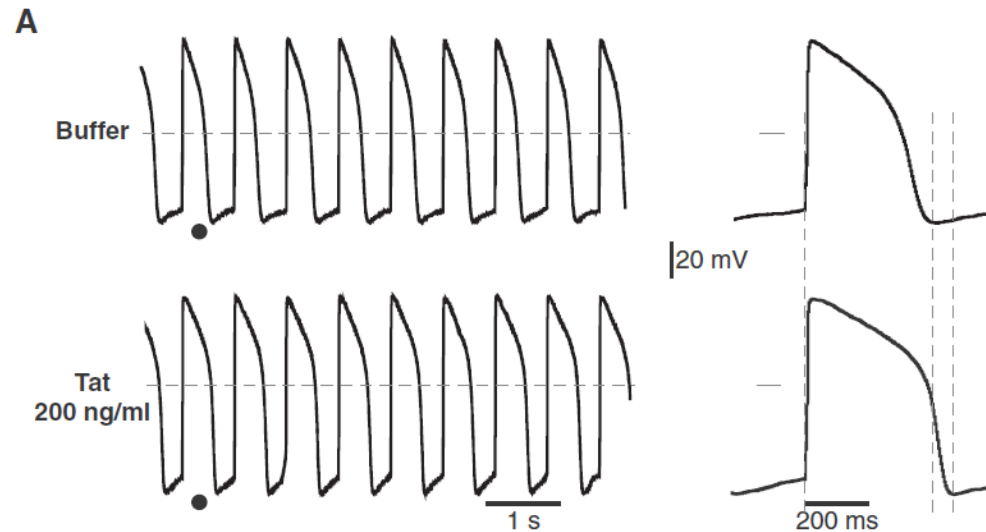
- **application de la protéine Tat**
: endocytose uniquement dans les cardiomyocytes



cardiomyocytes
issus de cellules hiPS

Condition : application **extracellulaire** de la protéine Tat

- potentiel d'action

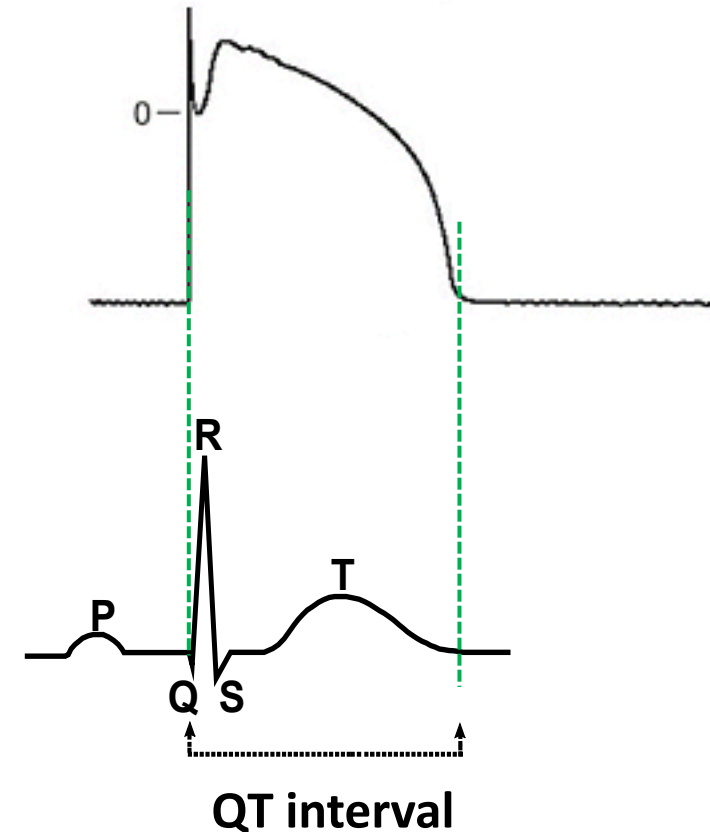
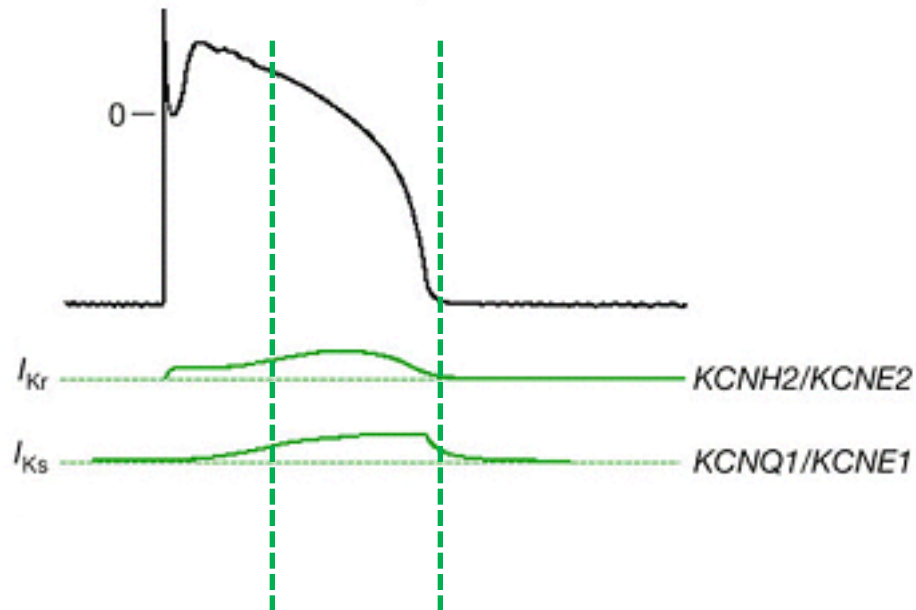


- allongement de la durée du potentiel d'action induit par la Tat (phases tardives)

Figure 7

Conclusions

"Altogether, these data obtained on human K^+ channels both in heterologous expression systems and in human cardiomyocytes 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."

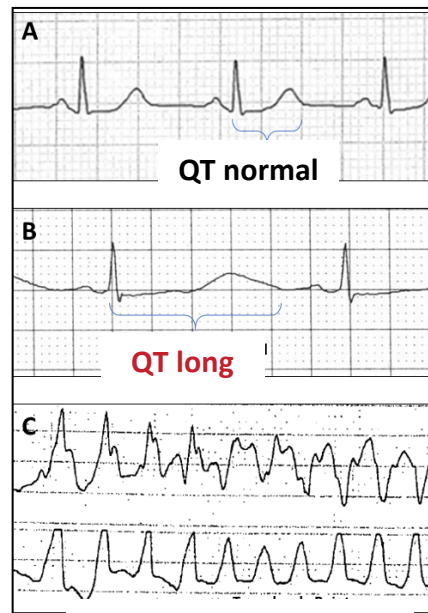


Syndrome du QT long congénital : variants de *KCNH2*

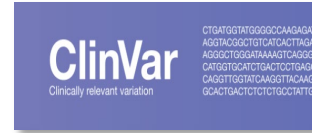
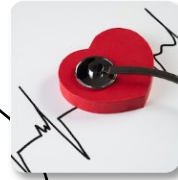
Contexte du projet

Mutations perte de fonction du gène codant le canal hERG (*KCNH2*)

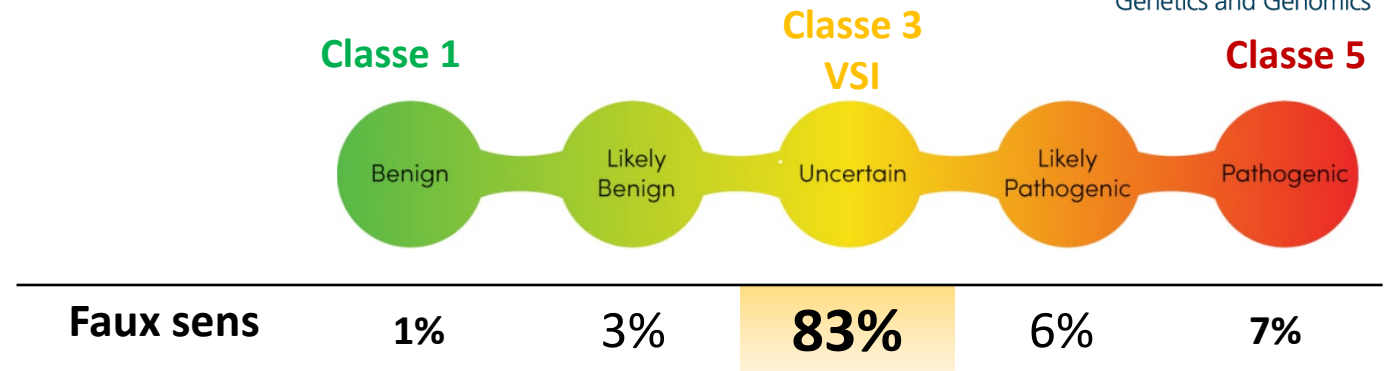
ECG



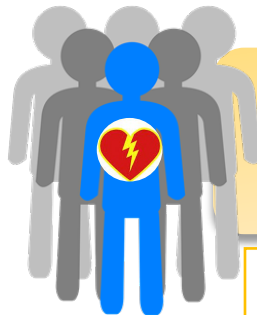
Syncopes et mort subite



2800 variants de *KCNH2* (1159 a.a.)
dont 2057 faux sens



VSI: Variants de Signification Inconnue



Besoin clinique: caractérisation fonctionnelle à haut débit de variants VSI

Stratification optimale du risque rythmique des patients

Alameh M *et al.* Front Physiol. 2023 Feb 13;14:1132533.

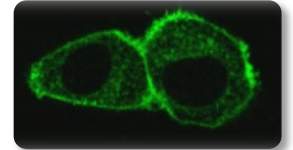
Caractérisation de l'ensemble des variants du gène *KCNH2*

Caractérisation multiparamétrique

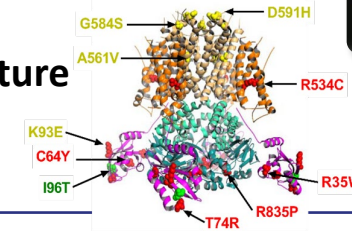


patch-clamp automatisé à haut débit
(384 cellules en simultanément)

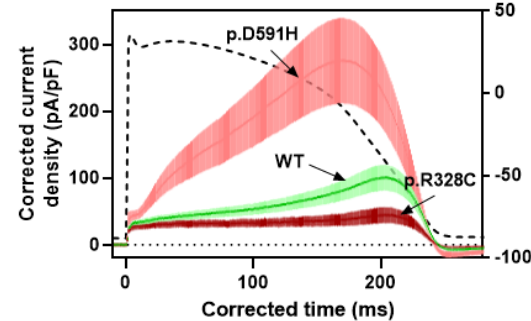
trafic à la membrane



structure



Score de pathogénicité moléculaire



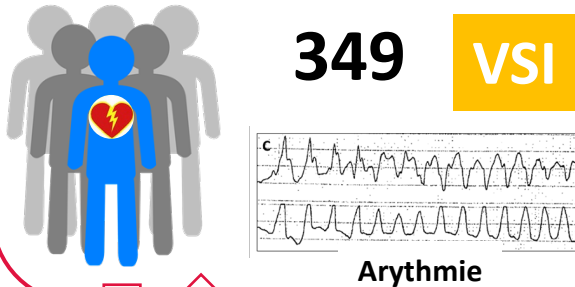
pouvoir de repolarisation



Variants bénins et pathogènes

Score final de pathogénicité pour le patient

= score moléculaire + score génétique



Informations
cliniques

Diagnostic
complet

Base de données
internationale
dynamique



Informations fonctionnelles complètes + génétiques + cliniques

Oliveira-Mendes BBR *et al.* Clin Transl Med. 2023
May;13(5):e1266.

**Labo. de recherche de
*l'institut du thorax***

Mariam Jouni
Zeineb Es-Salah-Lamoureux
Olfat Malak
Zena Reda Al-Sayed
Jérôme Montnach
Virgine Forest
Béatrice Ollivier
Aurore Girardeau
Barbara Ribeiro
Nathalie Gaborit
Gildas Loussouarn
Flavien Charpentier
Jean-Jacques Schott
Guillaume Lamirault
Patricia Lemarchand
Richard Redon



isabelle.baro@univ-nantes.fr
L'unité de recherche de l'institut du thorax
Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291
Nantes, France



iPSC core facility

Libanese University
Team 045: Stem cells
Kasem Zibara

***l'institut du thorax* CIC**
Vincent Probst
Jean-Baptiste Gourraud

Fundings



umr1087.univ-nantes.fr



Daniel Buren et Patrick Bouchain, Les Anneaux, Quai des Antilles, Nantes, création pérenne Estuaire 2007 © Martin Argirolo/LVAN