



Université de Sherbrooke

# **Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans la genèse de phénomènes arythmogéniques en conditions physiopathologiques**

par  
BIET Michaël  
Département de Physiologie et Biophysique

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de  
l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D) en physiologie et biophysique

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mois, 2014

Membres du jury d'évaluation:

Pr Robert DUMAINE, département de physiologie et biophysique  
Pr Paul PAPE, département de physiologie et biophysique  
Pre Danielle JACQUES, département d'anatomie et biologie cellulaire  
Pr Mohamed CHAHINE, faculté de médecine, département de médecine, Québec

© BIET Michaël, 2014

## Résumé

Le potentiel d'action cardiaque est un phénomène électrique finement régulé par des modifications du voltage membranaire engendré par l'ouverture de différents canaux ioniques (sodium, calcium, chlore et potassium) présents à la surface des cardiomyocytes. Les transferts d'ions, de part et d'autre de la membrane via ces canaux, génèrent des courants pouvant être mesurés par la technique de patch clamp. L'activité électrique cardiaque est donc la résultante d'un équilibre de différents flux d'ions qui peut également être modulé par les systèmes sympathique et parasympathique afin de permettre l'adaptation du rythme cardiaque.

Le courant sodique ( $I_{Na}$ ) est responsable de l'initiation des potentiels d'action (PA) et module sa durée. Il joue donc un rôle prépondérant dans l'excitabilité cardiaque et la conduction de l'influx électrique. De par ce fait, une modification des propriétés biophysiques d' $I_{Na}$  lors de conditions physiopathologiques peut engendrer des troubles du rythme.  $I_{Na}$  est divisé en phases rapide ( $I_{Na\text{ pic}}$ ) et soutenue ( $I_{NaL}$ ) qui interviennent respectivement dans l'excitabilité et la durée d'un PA (phase de plateau). De plus, notre laboratoire a démontré que les canaux sodiques de types cardiaque (NaV1.5) et neuronaux (nNaVs) contribuent à  $I_{Na}$ . Chacun se différencie par leurs propriétés biophysiques, leurs contributions à  $I_{Na}$  (pic et soutenu) ainsi qu'à leurs sensibilités à la tétrodotoxine (TTX).

Nous avons étudié les effets précoces d'un diabète de type II, de l'exposition *in-utero* à la nicotine des nouveau-nés, de l'épilepsie et de l'ischémie sur les propriétés biophysiques du courant sodique cardiaque  $I_{Na}$  responsable de l'impulsion électrique menant au battement cardiaque. Ces pathologies ont comme point commun l'apparition de troubles du rythme cardiaque tels que des bradycardies, des troubles de conduction menant parfois à des blocs auriculo-ventriculaires (BAV), des insuffisances cardiaques ou encore des problèmes d'excitabilité pouvant tous être reliés au courant sodique.

Nos résultats montrent que toutes ces conditions physiopathologiques altèrent les propriétés du courant sodique en augmentant l'amplitude du courant  $I_{Na}$  (diabète, exposition *in-utero* à la nicotine, épilepsie), l'excitabilité (diabète, exposition *in-utero* à la nicotine, épilepsie) ou en augmentant le taux de participation des nNaVs à  $I_{NaL}$  (épilepsie, ischémie). Nos données concordent avec la littérature et les observations cliniques et permettent d'expliquer en partie l'apparition de ces anomalies de troubles du rythme survenant chez les personnes atteintes de ces pathologies.

Mots-clés: *physiologie cardiaque, biophysique, canaux sodiques cardiaque, canaux sodiques neuronaux, patch clamp, arythmies cardiaques, mort subite, acides gras libres, nicotine, épilepsie, ischémie, chiens, rats, lapins.*

# Table des Matières

<b>Résumé.....</b>	<b>II</b>
<b>Table des Matières.....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>IX</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>XII</b>
<b>Chapitre I: INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Anatomie du muscle cardiaque.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Système de conduction cardiaque : structure et implication dans l'apparition de trouble du rythme.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Description d'un PA cardiaque et des différents courants impliqués ....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Rôle des différentes composantes d'<math>I_{Na}</math> dans un PA.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Les différents types de canaux sodiques exprimés au niveau cardiaque participant au courant <math>I_{Na}</math>.....</b>	<b>9</b>
1.5.1 Les canaux sodiques de type cardiaque (NaV1.5).....	10
1.5.2 Les canaux sodiques de type neuronal (nNaVs).....	11
<b>1.6 Structures des canaux sodiques.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Les différentes configurations des canaux sodiques.....</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Propriétés biophysiques des canaux sodiques : comparaison entre NaV1.5 et les nNaVs.....</b>	<b>17</b>
<b>1.9 La repolarisation ventriculaire : un phénomène hétérogène finement régulé.....</b>	<b>19</b>
<b>1.10 Courant sodique et électrocardiogramme : rôle et contribution dans la genèse d'arythmies associées à l'ischémie et l'épilepsie.....</b>	<b>22</b>
<b>1.11 Rôle et implication du courant sodique en conditions physiopathologiques.....</b>	<b>26</b>
1.11.1 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans les insuffisances cardiaques liées au diabète.....	26
1.11.2 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans le syndrome de mort subite du nouveau-né (SMSN) lié au tabagisme.....	29
1.11.3 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans l'épilepsie ...	33

1.11.4 Rôle et implication du courant sodique cardiaque en condition ischémique.....	39
<b>Chapitre II: Matériel et Méthodes .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Modèles animaux.....</b>	<b>43</b>
2.1.1 Étude de l'impact d'une augmentation d'acides gras libres circulants sur le courant sodique cardiaque chez le chien .....	43
2.1.1.1 Préparation des animaux.....	43
2.1.1.2 Procédures chirurgicales .....	44
2.1.2 Effet d'une exposition <i>in-utero</i> à la nicotine sur le courant sodique cardiaque chez le lapin .....	46
2.1.3 Effet de l'épilepsie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque .....	47
2.1.4 Effet de l'ischémie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque .....	48
<b>2.2 Prélèvement du cœur et dissociation cellulaire cardiaque.....</b>	<b>48</b>
<b>2.3 Électrophysiologie.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4 Analyses statistiques .....</b>	<b>51</b>
<b>Chapitre III: Résultats .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Effets d'une augmentation systémique d'acides gras libres chez le chien sur les propriétés électrophysiologiques du courant sodique cardiaque.....</b>	<b>52</b>
3.1.1 La procédure expérimentale n'augmente pas le niveau de stress des animaux .....	52
3.1.1.1 La procédure expérimentale n'augmente pas le taux plasmatique d'ACTH des animaux.....	52
3.1.1.2 La procédure expérimentale n'augmente pas le taux de cortisol plasmatique des animaux.....	53
3.1.2 La co-perfusion de triglycérides (TG) et d'héparine augmente significativement les taux plasmatiques de TG et d'AGNE chez les chiens IH .....	54
3.1.2.1 Augmentation du taux de TG chez les chiens IH.....	54
3.1.2.2 Augmentation du taux d'AGNE chez les chiens IH.....	55
3.1.3 La perfusion d'acides gras libres augmente la densité de courant, décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés et augmente l'amplitude du courant de fenêtre d'I <sub>Na</sub> .....	56

3.1.3.1	<i>La perfusion d'acides gras libres augmente la densité de courant et décale la courbe d'activation d'<math>I_{Na}</math> vers des potentiels plus négatifs.....</i>	56
3.1.3.2	<i>La perfusion systémique d'acides gras libres diminue la disponibilité des canaux sodiques.....</i>	59
3.1.3.3	<i>La perfusion systémique d'acides gras libres augmente l'amplitude du courant de fenêtre .....</i>	61
3.1.3.4	<i>La perfusion systémique d'acides gras libres augmente faiblement le temps de réactivation des canaux sodiques.....</i>	63
<b>3.2</b>	<b>L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine chez des lapins nouveau-nés modifie les paramètres biophysiques des canaux sodiques, augmente la densité d'<math>I_{Na}</math> et abolit les effets d'une stimulation adrénergique .....</b>	<b>67</b>
3.2.1	L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine augmente la densité de courant $I_{Na}$ et décale la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs .....	67
3.2.2	L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine diminue la disponibilité des canaux sodiques chez le lapin nouveau-né de 37 jours .....	70
3.2.3	L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine abolit les effets d'une stimulation $\beta$ -adrénergique sur $I_{Na}$ .....	72
3.2.4	L'isoprotérénol diminue la disponibilité des canaux sodiques .....	74
<b>3.3</b>	<b>L'épilepsie augmente la densité du courant <math>I_{Na}</math>, augmente l'amplitude d'<math>I_{NaL}</math> et modifie l'activité des protéines kinases A et C sur les paramètres biophysiques des canaux sodiques .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	L'épilepsie augmente l'excitabilité cardiaque, diminue la disponibilité et réduit le temps de réactivation des canaux sodiques.....	78
3.3.1.1	<i>L'épilepsie augmente la densité de courant <math>I_{Na}</math> et décale la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs.....</i>	78
3.3.1.2	<i>L'épilepsie diminue la disponibilité des canaux sodiques .....</i>	81
3.3.1.3	<i>L'épilepsie augmente le temps de réactivation des canaux sodiques .....</i>	83
3.3.2	L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ ainsi que la participation des nNavs à $I_{NaL}$ .....	85
3.3.3	L'épilepsie diminue la réponse à une stimulation $\beta$ -adrénergique.....	91
3.3.3.1	<i>L'épilepsie ne modifie pas l'effet d'une stimulation <math>\beta</math>-adrénergique sur le courant <math>I_{Na, Max}</math>, mais réduit le décalage de la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs.....</i>	91
3.3.3.2	<i>L'isoprotérénol diminue moins fortement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique .....</i>	95

3.3.3.3	<i>L'isoprotérénol augmente le temps de réactivation des canaux sodiques uniquement en condition sham</i> .....	97
3.3.4	L'épilepsie ne modifie pas l'activité de la PKC sur les paramètres d'activation et de réactivation des canaux sodiques. En revanche, la PKC est impliquée dans la modulation de la disponibilité des canaux sodiques en épilepsie.....	99
3.3.4.1	<i>L'inhibition de la PKC entraîne une augmentation de l'amplitude d'<math>I_{Na, Max}</math>, une augmentation de la conductance maximale ainsi qu'un décalage négatif de la courbe <math>m^\infty</math> en condition sham et épileptique</i> .....	99
3.3.4.2	<i>La chélérythrine diminue uniquement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique</i> .....	102
3.3.4.3	<i>L'inhibition de la PKC ne module pas le temps de réactivation des canaux sodiques</i> .....	104
3.3.5	L'épilepsie semble diminuer l'activité de la PKA .....	105
3.3.5.1	<i>L'inhibition de la PKA entraîne une légère augmentation de l'amplitude d'<math>I_{Na, Max}</math> ainsi qu'un décalage négatif de la courbe <math>m^\infty</math> en condition sham et épileptique</i> .....	105
3.3.5.2	<i>Le H-89 diminue la disponibilité des canaux sodiques en condition sham et épileptique</i> .....	108
3.3.5.3	<i>L'inhibition de la PKA augmente le temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique</i> .....	110
<b>3.4</b>	<b>L'ischémie diminue l'amplitude maximale du courant <math>I_{Na}</math> mais augmente <math>I_{NaL}</math>. Les canaux sodiques de type neuronaux contribuent de façon significative à la repolarisation en condition ischémique</b> .....	<b>114</b>
3.4.1	L'ischémie diminue la densité et le courant de pic $I_{Na}$ sans modifier l'activation des canaux sodiques.....	114
3.4.2	L'ischémie diminue la disponibilité des canaux sodiques.....	116
3.4.3	Le MTSEA bloque la même fraction du courant de pic en condition contrôle et ischémique .....	118
3.4.4	L'ischémie ne modifie pas les propriétés d'activation des canaux sodiques de type non cardiaque .....	120
3.4.5	L'ischémie ne modifie pas la disponibilité des nNaVs .....	121
3.4.6	Limites d'utilisation du MTSEA.....	123
3.4.7	L'ischémie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ .....	125
3.4.8	Résultats préliminaires sur le taux de participation des nNaVs à $I_{NaL}$	128
<b>Chapitre IV:</b>	<b>Discussion &amp; Conclusions</b> .....	<b>132</b>
<b>4.1</b>	<b>Étude de l'impact d'une augmentation d'acides gras libres circulants sur le courant sodique cardiaque chez le chien</b> .....	<b>132</b>

<b>4.2 Effet d'une exposition <i>in-utero</i> à la nicotine sur le courant sodique..</b>	<b>137</b>
4.2.1 Effet d'une exposition prénatale ( <i>in-utero</i> ) à la nicotine sur les propriétés biophysiques d' $I_{Na}$ chez le lapin nouveau-né de 37 jours.....	137
4.2.2 Une exposition <i>in-utero</i> à la nicotine abolit la réponse à une stimulation $\beta$ -adrénergique au niveau cardiaque .....	139
<b>4.3 Effet de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques cardiaques. Parallèle entre les troubles neurologiques et cardiaques.....</b>	<b>141</b>
4.3.1 Mutations et épilepsie .....	141
4.3.2 Hyperexcitabilité et épilepsie.....	142
4.3.3 $I_{Na, Max}$ et épilepsie .....	143
4.3.4 L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ en augmentant la contribution des nNaVs .....	149
4.3.5 Troubles de conduction et épilepsie.....	152
<b>4.4 Effet de l'ischémie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque.....</b>	<b>157</b>
<b>Perspectives &amp; Conclusion Générale.....</b>	<b>161</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>166</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>168</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions contrôle et IH.....	65
<b>Tableau 2</b> Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions sham et nicotine.....	76
<b>Tableau 3</b> Amplitudes du courant $I_{NaL}$ exprimées en pA/pF selon la concentration de TTX perfusée pour les conditions sham et épileptique.....	91
<b>Tableau 4</b> Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions sham et épileptique.....	113
<b>Tableau 5</b> Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions contrôle et ischémique .....	130
<b>Tableau 6</b> Résumé des effets des différentes conditions physiopathologiques sur les paramètres biophysiques du courant sodique. ....	165

## Liste des figures

Figure 1.1 Anatomie du muscle cardiaque.....	2
Figure 1.2 Système de conduction cardiaque.....	4
Figure 1.3 Différences de concentrations intra et extracellulaire des principaux ions .....	5
Figure 1.4 Les différentes phases d'un potentiel d'action cardiaque.....	7
Figure 1.5 Les différentes composantes du courant sodique.....	9
Figure 1.6 Participation de NaV1.5 à $I_{Na}$ pic et $I_{NaL}$ .....	11
Figure 1.7 Participation des nNavs à $I_{Na}$ pic et $I_{NaL}$ .....	13
Figure 1.8 Structure des canaux sodiques.....	15
Figure 1.9 Les différents états des canaux sodiques.....	16
Figure 1.10 Différences entre les propriétés biophysiques des canaux sodiques TTX-résistants (NaV1.5; ●) et TTX-sensibles (nNavs; ○).....	18
Figure 1.11 Les différents types de potentiels d'action cardiaques selon leur localisation.....	21
Figure 1.12 Électrocardiogramme et activité électrique cardiaque.....	25
Figure 3.1.1.1 Concentration plasmatique d'ACTH chez les chiens sham et IH	53
Figure 3.1.1.2 Concentration plasmatique de cortisol chez les chiens sham IH	54
Figure 3.1.2.1 Concentration plasmatique de triglycérides chez les chiens sham et IH.....	55
Figure 3.1.2.2 Concentration plasmatique des AGNE chez les chiens sham et IH .....	56
Figure 3.1.3.1 L'augmentation d'acides gras libres circulants chez le chien augmente la densité et décale la courbe d'activation d' $I_{Na}$ vers des potentiels plus négatifs.....	58
Figure 3.1.3.2 La perfusion d'acides gras libres diminue la disponibilité des canaux sodiques.....	60
Figure 3.1.3.3 La perfusion d'acides gras libres circulants augmente le courant de fenêtre sodique.....	62
Figure 3.1.3.4 L'augmentation d'acides gras libres circulants chez le chien ne modifie pas le temps de réactivation des canaux sodiques.....	64

Figure 3.2.1 L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine augmente l'amplitude du courant sodique et décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs chez le lapin nouveau-né de 37 jours.....	69
Figure 3.2.2 L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine ne modifie pas la disponibilité des canaux sodiques chez le lapin nouveau-né de 37 jours.....	71
Figure 3.2.3 L'exposition <i>in-utero</i> à la nicotine abolit les effets d'une stimulation $\beta$ -adrénergique sur $I_{Na}$ .....	73
Figure 3.2.4 L'isoprotérénol ne modifie pas la disponibilité des canaux sodiques .....	75
Figure 3.3.1.1 L'épilepsie augmente l'amplitude du courant sodique et décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs .....	80
Figure 3.3.1.2 L'épilepsie diminue la disponibilité des canaux sodiques.....	82
Figure 3.3.1.3 L'épilepsie augmente le temps de réactivation des canaux sodiques .....	84
Figure 3.3.2.1 L'épilepsie augmente l'amplitude de la composante soutenue du courant sodique ainsi que la contribution des canaux sodiques TTX-sensibles..	87
Figure 3.3.2.2 L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ ainsi que la contribution des nNavs sur une large gamme de potentiels membranaires .....	90
Figure 3.3.3.1 L'isoprotérénol augmente à la fois la densité de courant et la conductance maximale pour les conditions sham et épileptiques. L'épilepsie réduit l'effet de l'isoprotérénol sur la courbe $m^\infty$ .....	94
Figure 3.3.3.2 L'isoprotérénol diminue moins fortement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique .....	96
Figure 3.3.3.3 L'isoprotérénol diminue le temps de réactivation des canaux sodiques uniquement en condition sham .....	98
Figure 3.3.4.1 La chélérythrine double la densité de courant et augmente l'excitabilité en conditions sham et épileptique.....	101
Figure 3.3.4.2 La chélérythrine diminue la disponibilité des canaux sodiques uniquement en condition épileptique.....	103
Figure 3.3.4.3 L'inhibition de la PKC n'entraîne pas de modification du temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique .....	105
Figure 3.3.5.1 L'inhibition de la PKA augmente l'amplitude du courant sodique et l'excitabilité.....	107
Figure 3.3.5.2 L'inhibition de la PKA diminue la disponibilité des canaux sodiques en condition sham et épileptique.....	109

Figure 3.3.5.3 L'inhibition de la PKA retarde la réactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique.....	111
Figure 3.4.1 L'ischémie diminue l'amplitude maximale du courant sodique chez le chien .....	115
Figure 3.4.2 L'ischémie diminue la disponibilité des canaux sodiques chez le chien .....	117
Figure 3.4.3 L'ischémie ne modifie pas le pourcentage de participation des canaux sodiques de type non cardiaque au courant $I_{Na, Max}$ .....	119
Figure 3.4.4 L'ischémie ne modifie pas l'activation des canaux sodiques de type 1.5 et neuronaux .....	121
Figure 3.4.5 L'ischémie ne modifie pas la disponibilité des canaux MTSEA insensibles .....	122
Figure 3.4.6 Le MTSEA décale les courbes d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés pour les conditions contrôle et ischémique .....	124
Figure 3.4.7 L'ischémie augmente l'amplitude de la composante soutenue du courant sodique ( $I_{NaL}$ ).....	127
Figure 3.4.8 Résultats préliminaires sur le taux de participation des différents types de NaVs participant à $I_{NaL}$ .....	129

## Liste des abréviations

AC	<i>Adénylate Cyclase</i>
ACTH	<i>Adrénocorticotrophine</i>
AG	<i>Acides Gras</i>
AGNE	<i>Acides Gras Non Estérifiés</i>
AMPc	<i>Adénosine Mono Phosphate cyclique</i>
AR	<i>Auto-Réanimation</i>
ATP	<i>Adénosine Triphosphate</i>
AV	<i>Auriculo-Ventriculaire</i>
BAV	<i>Bloc Auriculo-Ventriculaire</i>
CaMKII	<i>Calmoduline Kinase II</i>
CD	<i>Cardiomyopathie Diabétique</i>
DPA	<i>Durée d'un Potentiel d'Action</i>
DT2	<i>Diabète de Type 2</i>
EADs	<i>'Early After Depolarization'</i>
ECG	<i>Électrocardiogramme</i>
FP	<i>Fibres de Purkinje</i>
G <sub>Max</sub>	<i>Conductance maximale</i>
h <sub>∞</sub>	<i>Courbe d'inactivation</i>
HEK	<i>'Human Embryonic Kidney'</i>
I/V	<i>Relation courant/potentiel</i>
I <sub>Ca</sub>	<i>Courant calcique</i>
ICC	<i>Insuffisance cardiaque congestive</i>
IH	<i>Intralipide Héparine</i>
I <sub>K1</sub>	<i>Courant potassique rectifiant entrant</i>
I <sub>KATP</sub>	<i>Courant potassique activé par une baisse de la [ATP]<sub>i</sub></i>
I <sub>Kr</sub>	<i>Courant potassique rapide rectifiant entrant</i>
I <sub>Ks</sub>	<i>Courant potassique lent rectifiant sortant</i>
I <sub>Na</sub>	<i>Courant sodique</i>
I <sub>Na, Max</sub>	<i>Courant sodique maximum</i>
I <sub>NaL</sub>	<i>Courant sodique soutenu</i>
I <sub>Na,W</sub>	<i>Courant de fenêtre sodique</i>
I <sub>to</sub>	<i>Courant potassique transitoire sortant</i>
m <sub>∞</sub>	<i>Courbe d'activation</i>
MSIE	<i>Mort Subite et Inexpliquée en Épilepsie</i>
MTSEA	<i>Méthane-Thio-Sulfonate-Éthyl-Amine</i>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	<i>Pompe Sodium/Potassium</i>
NaV1.5	<i>Canal sodique type cardiaque</i>
NCX	<i>Échangeur sodium-calcium</i>

nNaVs	<i>Canaux sodiques de type neuronaux</i>
PA	<i>Potentiel d'action</i>
PKA	<i>Protéine Kinase A</i>
PKC	<i>Protéine Kinase C</i>
PKI	<i>Protéine Kinase Inhibitrice</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate</i>
PUFAs	<i>Acides gras polyinsaturés ('Poly-Unsaturated-Fatty-acids')</i>
SA	<i>Sino-atrial</i>
SC	<i>Sous cutané</i>
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SMSN	<i>Syndrome de Mort Subite du Nouveau-né</i>
TG	<i>Triglycérides</i>
TTX	<i>Tétradotoxine</i>
TTX-r	<i>Canaux sodiques TTX résistants</i>
TTX-s	<i>Canaux sodiques TTX sensibles</i>
V <sub>1/2</sub>	<i>Potentiel de demi (in)activation</i>

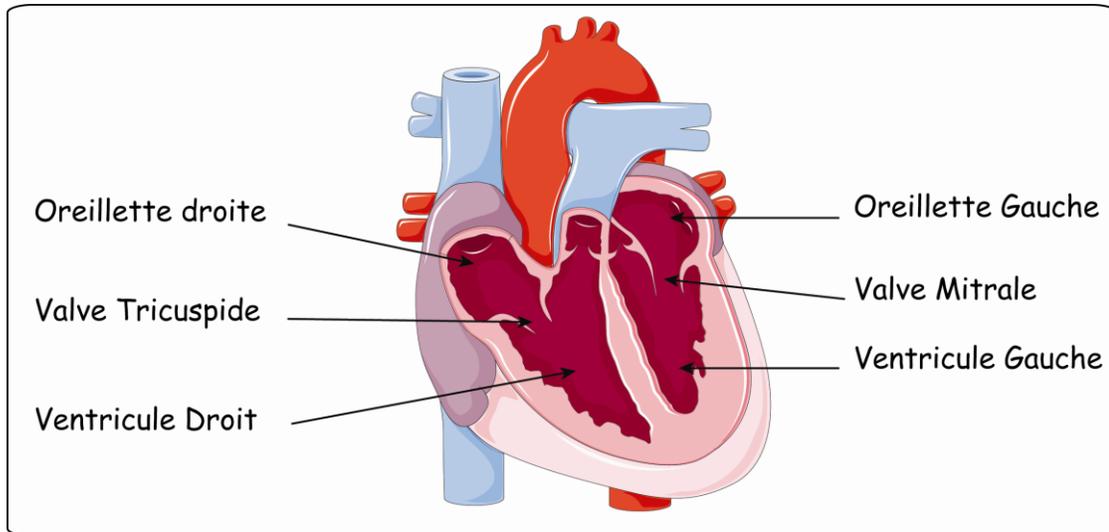
# Chapitre I: INTRODUCTION

Les canaux sodiques sont des protéines situées au niveau de la membrane plasmique et font partie de la famille des canaux ioniques. Ils sont dits canaux 'voltage dépendant' car leur ouverture est dépendante du potentiel membranaire. Lorsqu'ils sont ouverts, les canaux sodiques permettent ainsi le passage d'ions chargés électriquement ( $\text{Na}^+$ ) de l'extérieur à l'intérieur de la cellule. Ce flux d'ions entrant correspond au courant sodique nommé  $I_{\text{Na}}$  qui est responsable de l'initiation et de la propagation des potentiels d'action (PA). Le but de cette thèse de doctorat est de déterminer comment certaines conditions physiopathologiques liées au diabète, à l'exposition *in-utero* à la nicotine, à l'épilepsie et à l'ischémie affectent l'activité des canaux sodiques cardiaques. Ces conditions physiopathologiques causent des problèmes de conduction et d'excitabilité et sont responsables d'arythmies cardiaques pouvant mener dans certains cas à une mort subite inexplicée. Le courant sodique est responsable de l'excitation et de la conduction au niveau cardiaque, il serait donc intéressant d'étudier les effets des différentes conditions pathologiques citées précédemment sur leurs propriétés biophysiques et de déterminer si des altérations au niveau du courant  $I_{\text{Na}}$  peuvent expliquer l'apparition de ces arythmies parfois létales.

## 1.1 Anatomie du muscle cardiaque

Le cœur est constitué de quatre cavités appelées oreillettes (gauche et droite) et ventricules (gauche et droit) (**Figure 1.1**). Il est responsable de la circulation sanguine générale et pulmonaire, mais il possède également son propre système circulatoire appelé système coronarien. Les acides gras (AG) libres sont le principal substrat énergétique du cœur et représentent environ 60% de la production d'ATP. En effet, la dégradation d'une molécule de glucose produit

presque trois fois moins de molécules d'ATP que l'oxydation d'un AG libre. Par contre, une trop grande concentration en acide gras plasmatique peut entraîner l'obstruction des artères coronaires suite à la formation de plaques d'athéromes (accumulation de gras) et mener à un manque d'oxygène (hypoxie) suite à un arrêt de la circulation sanguine (ischémie).



### **Figure 1.1 Anatomie du muscle cardiaque**

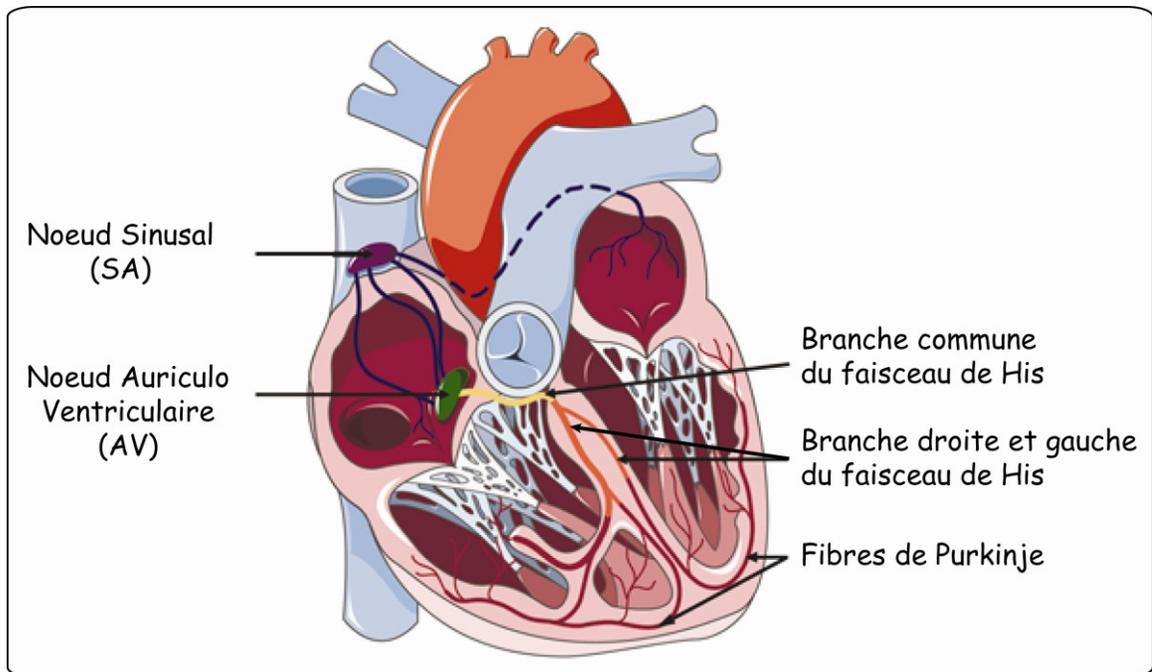
Le cœur est constitué de quatre cavités : oreillettes droite et gauche; ventricules droit et gauche. Ces cavités sont séparées par des valves appelées tricuspide (droite) et mitrale (gauche). Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ».

## **1.2 Système de conduction cardiaque : structure et implication dans l'apparition de trouble du rythme**

Le muscle cardiaque a la particularité de se contracter de façon autonome. Son activité contractile spontanée est engendrée par la génération et la dispersion d'un influx électrique appelé potentiel d'action (PA). Cet influx électrique va être responsable de l'apparition d'une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule cardiaque, mais également entre les cellules. Pour transmettre cet influx, le cœur dispose d'un système de conduction divisé en plusieurs parties, illustrées sur la **figure 1.2**. L'activité électrique prend naissance au niveau du nœud sino-atrial (SA) situé sur l'oreillette droite. Le nœud SA joue

donc le rôle de 'pacemaker' et détermine le rythme cardiaque. L'influx électrique se propage ensuite au niveau des oreillettes pour arriver au nœud auriculo-ventriculaire (AV) situé entre les oreillettes et les ventricules. Finalement, les PA se propagent au niveau des ventricules via les faisceaux de His (gauche et droite) qui se terminent en fibres de Purkinje (FP), permettant ainsi une contraction synchronisée des deux ventricules.

Cependant, des altérations de la conduction de l'influx électrique cardiaque peuvent entraîner l'apparition de troubles du rythme. Le bloc auriculo-ventriculaire (BAV) est un des troubles de conduction les plus communs et correspond à un défaut de transmission de l'influx électrique des oreillettes vers les ventricules. En épilepsie notamment, plusieurs études rapportent l'apparition de troubles de conduction pouvant mener à des BAV dans les 30 minutes post-ictus (Nei *et al.*, 2000; Tigarán *et al.*, 2002). L'ischémie est également reliée à des problèmes de conduction. Dans ce cas, la transmission de l'influx électrique au sein de la zone ischémique est ralentie, voire abolie. En revanche, en condition ischémique, le problème de conduction provient de la transmission intercellulaire et plus précisément au niveau des disques intercalaires qui se situent aux extrémités des cardiomyocytes.



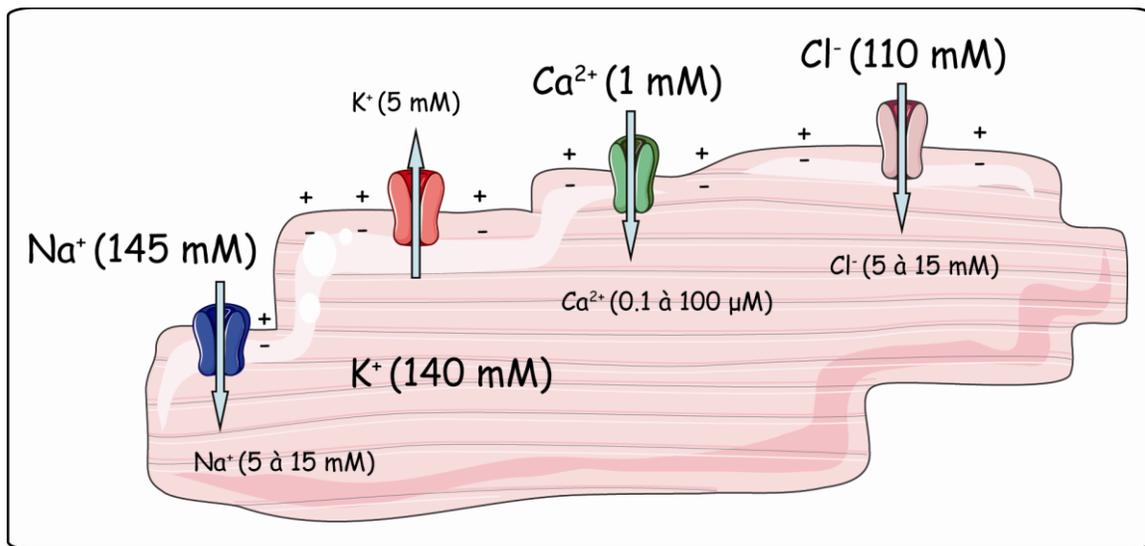
### Figure 1.2 Système de conduction cardiaque

L'influx électrique cardiaque est généré de façon spontanée au niveau du nœud SA (Sino-Atrial). Le nœud AV intègre les informations provenant des oreillettes et les transmet au niveau des ventricules via les faisceaux de His dans un premier temps, puis par les fibres de Purkinje. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ».

### 1.3 Description d'un PA cardiaque et des différents courants impliqués

Les PA sont déclenchés de façon automatique au niveau du nœud SA par un changement spontané du potentiel membranaire vers des valeurs plus positives (dépolariation). Ce changement de potentiel membranaire est dû aux passages de différents types d'ions de part et d'autre de la membrane. Le passage des ions s'effectue selon un gradient électrochimique et entraîne soit une entrée (dépolariation) ou une sortie d'ions (repolarisation) (**Figure 1.3**). Le potentiel membranaire d'une cellule non stimulée s'appelle le potentiel membranaire de repos et sa valeur est de -80 mV au niveau des ventricules. Cependant, puisque le nœud SA est en constante activité, on parle plutôt de potentiel membranaire diastolique dont la valeur est comprise entre -60 et -50 mV. Les PA sont donc différents selon leur localisation au niveau du tissu cardiaque, mais ils ont tous la

particularité d'être déclenché lorsque le potentiel électrique de la cellule atteint un voltage seuil. On parle alors d'une réponse tout ou rien. Une dépolarisation correspond à une augmentation du potentiel membranaire (deviens plus positif) et réciproquement, une repolarisation correspond à une diminution de ce dernier (deviens plus négatif) (**Figure 1.4**). L'influx électrique traversant le cœur peut donc être assimilé à une onde de dépolarisation faisant intervenir plusieurs types de canaux ioniques présents au niveau membranaire. Les canaux ioniques peuvent être séparés en différentes classes suivant le type d'ions qui les traversent ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  etc...). Le passage des ions à travers les canaux ioniques dépend de leurs probabilités d'ouvertures. Cette probabilité d'ouverture varie en fonction du type de canal, mais également en fonction du voltage.



**Figure 1.3 Différences de concentrations intra et extracellulaires des principaux ions**

Au repos, l'intérieur de la cellule cardiaque est plus électronégatif que l'extérieur. Le passage des ions à travers la membrane s'effectue selon un gradient électrochimique (du milieu le plus concentré au moins concentré). Cela entraîne donc une entrée de sodium ( $\text{Na}^+$ ), de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de chlore ( $\text{Cl}^-$ ) et une sortie de potassium ( $\text{K}^+$ ). Parce qu'il est chargé négativement, l'entrée de chlore repolarise le potentiel membranaire. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ».

### Les 5 phases d'un PA (Figure 1.4) :

La phase 0 : Dépolarisation. C'est la phase de déclenchement du PA. Elle correspond à l'ouverture des canaux sodiques qui vont permettre l'entrée d'ions sodium à l'intérieur de la cellule. Cette entrée d'ions chargés positivement va engendrer un courant électrique entrant responsable de la dépolarisation de la membrane. Ce flux d'ions détermine le courant sodique  $I_{Na}$ . Un défaut dans les propriétés d'ouverture des canaux sodiques peut donc moduler la forme et altérer le déclenchement des PA. Les canaux sodiques sont donc responsables de l'excitabilité des cardiomyocytes adultes normaux.

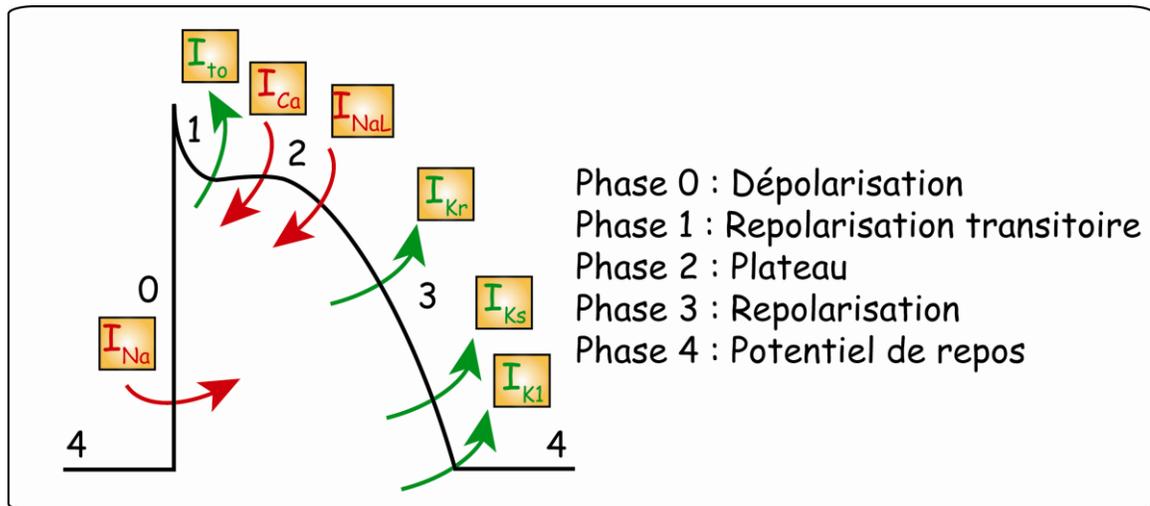
La phase 1 : Repolarisation transitoire. Elle correspond à l'ouverture de canaux potassiques qui vont permettre la sortie d'ions potassium à l'extérieur de la cellule. Le courant transitoire sortant généré par cette sortie d'ions  $K^+$  s'appelle  $I_{to}$  ('transient outward'). Le passage des ions  $K^+$  à travers la membrane plasmique se fait dans le sens contraire des ions  $Na^+$ . Le courant  $I_{to}$  s'oppose donc au courant  $I_{Na}$  et entraîne une repolarisation du potentiel membranaire.

La phase 2 : Plateau. La phase de plateau détermine la durée du PA (DPA). La phase de plateau et sa durée résultent d'un équilibre entre plusieurs types de courants entrant et sortant. Les deux principaux courants entrants participant à la phase de plateau sont  $I_{Ca}$  et  $I_{NaL}$ . Ce dernier est, par exemple, impliqué dans le syndrome de QT long (Napolitano et al., 2003). Ils correspondent respectivement aux courants calciques et à la phase soutenue du courant sodique. Une augmentation nette de la composante entrante va donc maintenir la dépolarisation et prolonger la DPA. À l'inverse, une augmentation nette de la composante sortante va réduire la DPA en accélérant la repolarisation. Il est à noter que des altérations de la DPA sont observées durant l'ischémie cardiaque et que certaines évidences pointent vers des changements similaires durant l'épilepsie.

La phase 3 : Repolarisation. Elle correspond à une sortie d'ions potassium et est générée principalement par deux types de canaux potassiques responsables des courants respectivement rapide et lent :  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ . Ces courants sont activés durant la phase 2 et contribuent également à la DPA en modulant la balance des courants entrants et sortants.

La phase 4 : Potentiel membranaire de repos. Cette phase dépend également d'un courant potassique nommé  $I_{K1}$ . La principale fonction de ce courant est de maintenir la cellule à son potentiel membranaire de repos.

Comme la composante soutenue du courant sodique participe activement à la phase 2 du PA nous avons voulu déterminer si une modulation d' $I_{NaL}$  pouvait être impliquée dans la prolongation de la DPA observée dans l'épilepsie et l'ischémie cardiaque.



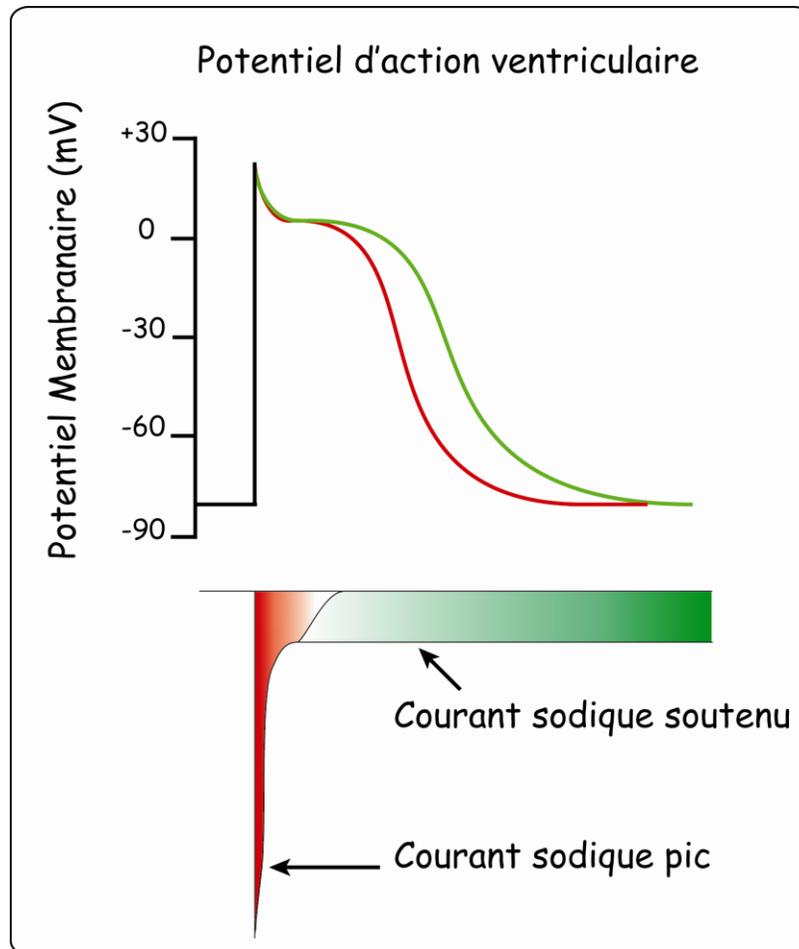
**Figure 1.4 Les différentes phases d'un potentiel d'action cardiaque**

Potentiel d'action ventriculaire cardiaque. Les courants représentés en rouge correspondent aux courants entrants (dépolarisants). Les courants représentés en vert correspondent aux courants sortants (repolarisants). Image réalisée à l'aide du programme « illustrator ».

#### 1.4 Rôle des différentes composantes d' $I_{Na}$ dans un PA

Nous avons vu que le courant sodique était responsable de la phase de dépolarisation d'un PA mais qu'il intervenait également au niveau de la phase de plateau. En fait, on peut diviser le courant sodique en 2 phases : une phase rapide dite 'pic', et une phase lente dite 'soutenue'. Comme le montre la **figure 1.5**, la phase pic du courant sodique est responsable du déclenchement du PA et donc de l'excitabilité, tandis que la composante soutenue appelée  $I_{NaL}$  peut moduler la durée de la phase de plateau d'un PA.

En épilepsie, l'amplitude d' $I_{NaL}$  générée par les canaux sodiques de type neuronaux est augmentée et cause une hyperactivité au niveau cérébral. Il est donc possible qu'une augmentation similaire d' $I_{NaL}$  au niveau cardiaque engendre une prolongation de la DPA. En condition ischémique, le courant  $I_{NaL}$  semble lui aussi impliqué puisque plusieurs études montrent que l'inhibition de ce courant par de la Ranolazine (bloqueur d' $I_{NaL}$ ) a des effets bénéfiques en réduisant notamment les dommages causés par l'ischémie (Belardinelli *et al.*, 2006; Hale et Kloner, 2006; Hale *et al.*, 2006; Shryock et Belardinelli, 2008; Soliman *et al.*, 2012).



### Figure 1.5 Les différentes composantes du courant sodique

Le courant sodique est composé d'une phase rapide (activation et inactivation rapide) et d'une phase soutenue (inactivation lente). La phase rapide participe au déclenchement du PA et module l'excitabilité des cardiomyocytes adultes normaux, tandis que la phase soutenue participe à la phase de plateau et module la DPA. Lorsque le courant soutenu augmente, la durée de la phase de plateau ainsi que la DPA sont augmentées (tracé vert). Image réalisée à l'aide du programme « illustrator ».

### 1.5 Les différents types de canaux sodiques exprimés au niveau cardiaque participant au courant $I_{Na}$

Deux types de canaux sodiques sont exprimés au niveau cardiaque, les canaux sodiques NaV1.5 (type cardiaque) et les nNavs (type neuronal). Dans cette section, nous aborderons dans un premier temps la participation de chacun des types de canaux à  $I_{Na}$  pic et  $I_{NaL}$  ainsi que leur localisation et leur différente sensibilité à la tétrodotoxine (TTX). Puis dans un second temps, nous verrons que

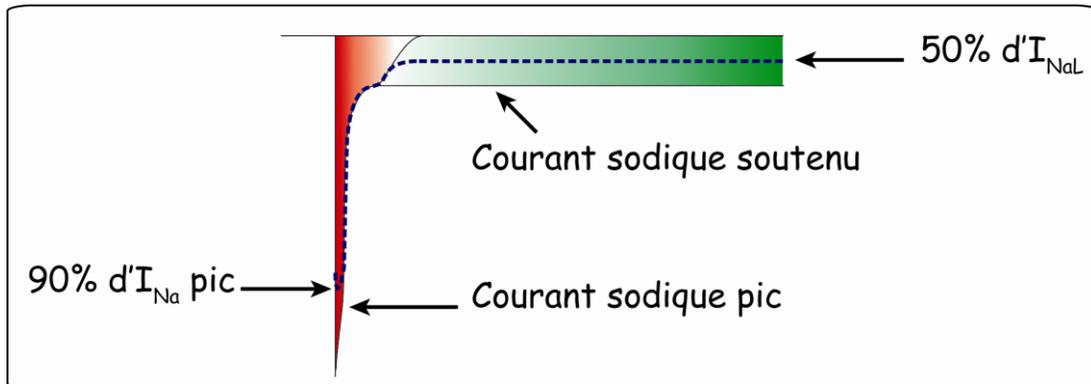
malgré leur très forte homologie structurelle, les canaux sodiques de type NaV1.5 et nNavs possèdent des propriétés électrophysiologiques différentes. Le rôle des nNavs dans la fonction cardiaque est encore méconnu. L'épilepsie et l'ischémie sont responsables de l'apparition d'arythmies cardiaques et il a été montré que les modifications induites par ces pathologies au niveau du courant sodique étaient compatibles avec les modifications d'expression et d'activité des différentes isoformes de canaux sodiques (French *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2011; Pu et Boyden, 1997). Ce sont les raisons pour lesquelles nous nous sommes intéressés aux effets de ces pathologies sur leur activité.

### 1.5.1 Les canaux sodiques de type cardiaque (NaV1.5)

Le gène SCN5A code pour les protéines NaV1.5 qui forment les canaux sodiques de type cardiaque et elles sont principalement exprimées au niveau du muscle cardiaque d'où leur appellation. NaV1.5 est exprimée au niveau des oreillettes et des ventricules, mais également au niveau des nœuds SA et AV (Lei *et al.*, 2007; Schram *et al.*, 2002). Le courant sodique engendré par ces canaux présente également deux phases: rapide et lente. Notre laboratoire a démontré chez le chien que les canaux NaV1.5 participaient plus au courant de pic (90%) qu'au courant soutenu (environ 50%) (Biet *et al.*, 2012; Haufe *et al.*, 2005a), faisant de NaV1.5 le principal contributeur de la phase 0 du PA et de l'excitabilité cardiaque (**Figure 1.6**). Afin de bloquer sélectivement le canal NaV1.5, nous avons utilisé le MTSEA (Methane-Thio-Sulfonyl-Ethyl-Amine) qui se fixe de façon covalente au niveau de la cystéine 372 et qui est absente chez les nNavs (Haufe *et al.*, 2005b). La TTX peut également bloquer NaV1.5, mais à une moindre sélectivité, lorsqu'elle est utilisée à de fortes concentrations (IC<sub>50</sub> de 1.8 µM) (Li *et al.*, 2009).

De nombreuses pathologies cardiaques, appelées maintenant canalopathies, ont pour origine une mutation sur le gène SCN5A. Les syndromes de Brugada et de QT long ont par exemple été associés à des mutations portant sur le gène SCN5A (Antzelevitch, 2006; Chiang et Roden, 2000). Dans le

syndrome de Brugada, les mutations des patients ont pour effet de diminuer l'amplitude d' $I_{Na}$  (perte de fonction), pouvant aboutir à la perte du plateau (Antzelevitch, 2006; Antzelevitch *et al.*, 2005). En revanche, on observe un gain de fonction du canal NaV1.5 chez les patients atteints du syndrome de QT long (LQTS de type 3 pour le gène SCN5A) où  $I_{NaL}$  est augmenté (Dumaine et Antzelevitch, 2002; Napolitano *et al.*, 2003). En effet, l'augmentation d' $I_{NaL}$  entraîne un allongement de la DPA (Chiang et Roden, 2000) se traduisant alors par un allongement de l'intervalle QT qui est un indicateur de la durée des PA ventriculaires. Les relations entre le courant sodique, le potentiel d'action et l'électrocardiogramme seront détaillées dans la section 1.10.



**Figure 1.6** Participation de NaV1.5 à  $I_{Na}$  pic et  $I_{NaL}$

Les canaux NaV1.5 participent respectivement à 90% et 50% des courants sodiques pic et soutenu. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator ».

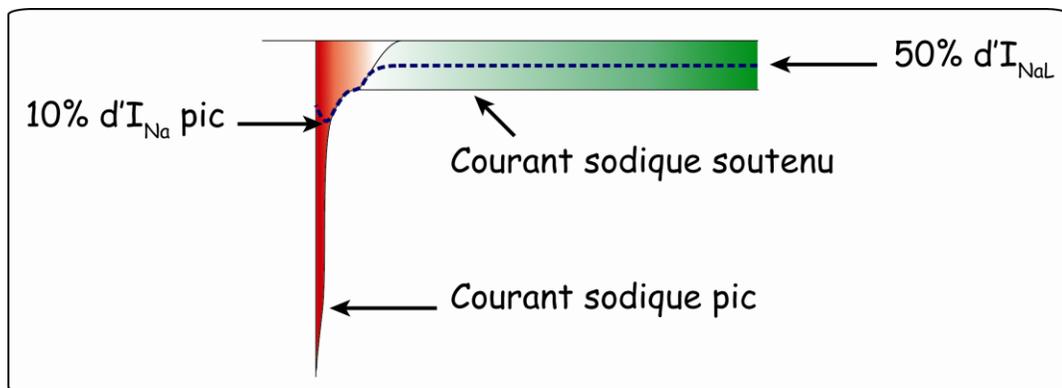
### 1.5.2 Les canaux sodiques de type neuronal (nNavs)

Il existe plusieurs isoformes de canaux sodiques de type neuronal (nNavs). Les gènes SCN1A, 2A, 3A, 6A, 7A et 8A codent chacun pour un isotype différent de nNav. Ces nNavs peuvent se diviser en deux groupes selon leur sensibilité à la TTX. En effet, les canaux sodiques NaV1.7 et 1.8 sont insensibles à la TTX tandis que les canaux NaV1.1, 1.2, 1.3 et 1.6 sont sensibles à de faibles concentrations de TTX ( $IC_{50}$  de 7.8 nM) (Li *et al.*, 2009). Coraboeuf *et al.* ont été les premiers à démontrer la présence de deux types de canaux sodiques de sensibilité différente à la TTX dans le cœur de chien (Coraboeuf *et al.*, 1979). Les auteurs montrent

également que l'effet de la TTX sur la DPA s'avère plus important au niveau des fibres de Purkinje que des cellules ventriculaires. Ces résultats montrent donc qu'il existe une composante sodique soutenue sensible à la TTX au niveau cardiaque et que celle-ci participe à la phase de plateau d'un PA. En 1992, Saint *et al.* confirment la présence d'une composante sodique persistante au sein des ventricules chez le rat (Saint *et al.*, 1992). Parce que les courants sodiques persistant et pic présentaient une dépendance au voltage différente et une sensibilité à la TTX différente (50  $\mu$ M et 0.1  $\mu$ M), les auteurs en ont conclu que les deux types de courants étaient générés par deux types de canaux sodiques. En 2005, notre laboratoire a démontré, chez le chien, la présence de canaux sodiques de types neuronaux au niveau cardiaque (Haufe *et al.*, 2005b). Ces résultats peuvent en partie expliquer les observations précédentes démontrant la présence de courants sodiques ayant des sensibilités différentes à la TTX dans le tissu cardiaque. Notre étude montre que les canaux sodiques NaV1.1 et 1.2 sont exprimés au niveau des ventricules, mais moins abondamment que dans les FP. La plus grande expression des canaux NaV1.1 et 1.2 (sensible à de faibles concentrations de TTX) dans les FP coïncident avec les résultats de Coraboeuf *et al.* (Coraboeuf *et al.*, 1979) qui montraient une plus grande sensibilité des FP à la TTX. De plus, nous avons démontré que les nNaVs participent davantage à  $I_{NaL}$  (proche de 50%) qu'au courant sodique pic (10%) (Biet *et al.*, 2012) (**Figure 1.7**).

L'ischémie est caractérisée par une dépolarisation du potentiel membranaire (Lukas et Antzelevitch, 1993) et par une augmentation de l'intervalle QT (Kenigsberg *et al.*, 2007). De plus, Ju *et al.* (Ju *et al.*, 1996) ont démontré que l'hypoxie entraînait une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  sur des ventricules de rats. Il est donc plausible que les nNaVs, de par leurs propriétés biophysiques et leurs contributions aux courants  $I_{Na}$  et  $I_{NaL}$  participent au maintien de l'excitabilité et de la transmission des PA lors d'ischémie. Cependant, une plus forte contribution des nNaVs en condition ischémique peut entraîner une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  et rallonger la DPA ainsi que l'intervalle QT.

Cet exemple peut être comparé à l'épilepsie. En effet, les mutations responsables d'épilepsie sont connues pour augmenter  $I_{NaL}$  au niveau neuronal et engendrer une hyperexcitabilité cérébrale responsable des ictus (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Cossette *et al.*, 2003; Kahlig *et al.*, 2006; Spampinato *et al.*, 2001). Cette augmentation d' $I_{NaL}$  dans les tissus neuronaux est également présente chez des rats épileptiques dépourvus de mutations (Chen *et al.*, 2011; French *et al.*, 1990). Les Morts Subites et Inexpliquées en Épilepsie (MSIE) sont associées à des troubles du rythme cardiaque et notamment à des QT longs suivis parfois de BAV (Nei *et al.*, 2000; Tigarán *et al.*, 2002). Ces observations nous ont donc menés à émettre l'hypothèse suivante : Si l'amplitude d' $I_{NaL}$  est également augmentée au niveau cardiaque cela peut-il, comme en condition ischémique, entraîner un allongement de la DPA, de l'intervalle QT et être à l'origine des MSIE?



**Figure 1.7** Participation des nNaVs à  $I_{Na\text{ pic}}$  et  $I_{NaL}$

Les canaux NaV1.1 participent respectivement à 10% et 50% des courants sodiques pic et soutenu. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator ».

## 1.6 Structures des canaux sodiques

Les canaux sodiques sont des protéines de 260 kDa constituées de 2016 acides aminés. Ce sont des monomères composés de quatre domaines transmembranaires (DI-DIV). Chaque domaine ou sous-unité alpha ( $\alpha$ ) est constitué de six segments transmembranaires. Ces canaux sont dits 'voltage dépendant' car leur ouverture dépend du potentiel membranaire. D'un point de vue structurel, le segment transmembranaire S4 de chaque sous-unité alpha confère la sensibilité au voltage des canaux (**Figure 1.8A**). Ce segment est riche en arginine

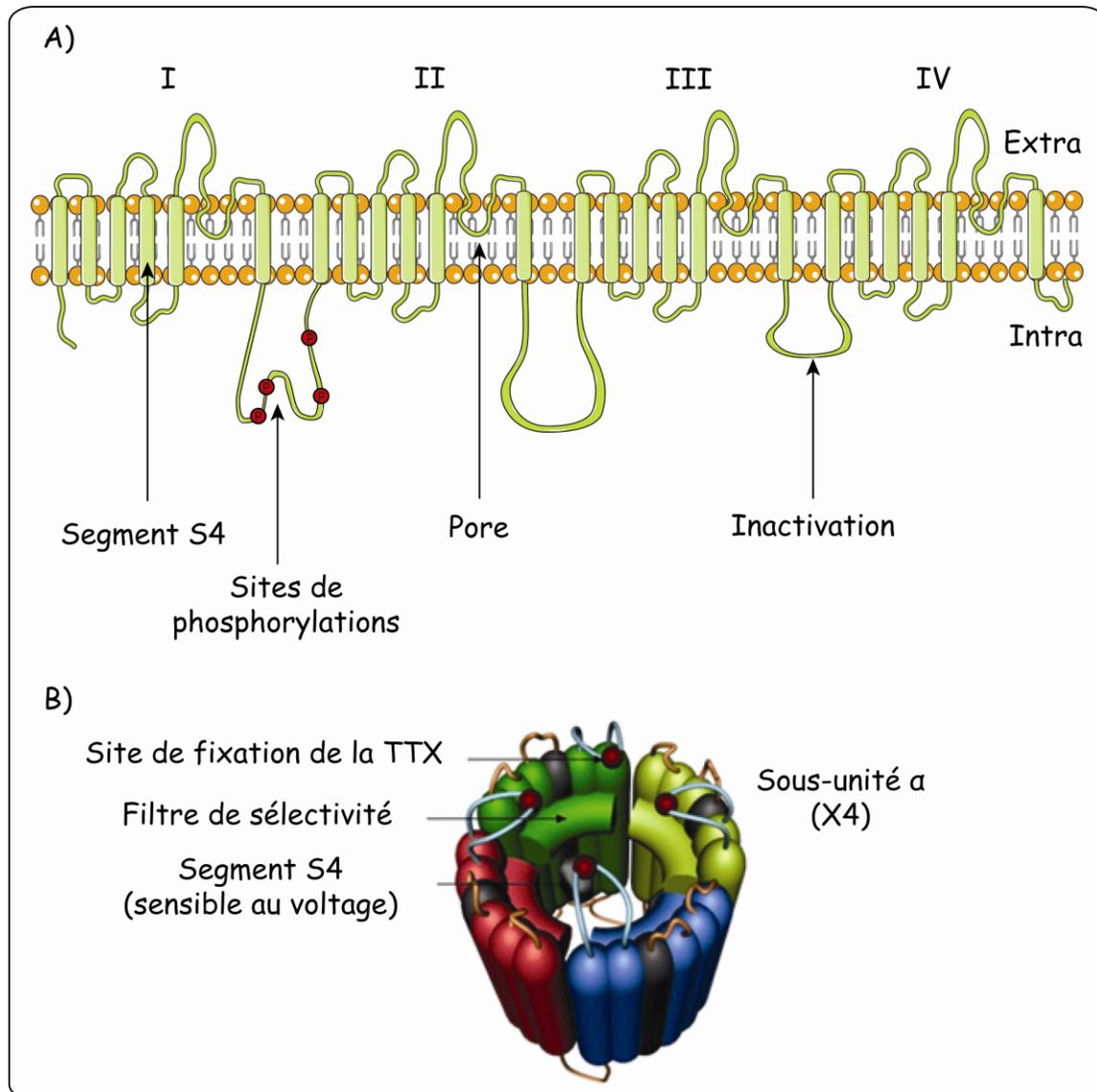
et lysine qui sont des acides aminés chargés positivement. Lors d'une dépolarisation membranaire, les quatre segments S4 s'élèvent ce qui a pour conséquence d'ouvrir le canal et de permettre l'entrée des ions sodium à l'intérieur de la cellule (Payandeh *et al.*, 2011).

Le pore du canal est formé par l'association des quatre boucles S5-S6 des sous-unités  $\alpha$ . La sélectivité du canal aux ions sodium est déterminée par un motif situé au niveau de la boucle S5-S6 comprenant 4 acides aminés : l'acide aspartique, le glutamate, la lysine et l'alanine (DEKA) (Yu et Catterall, 2003). Le pore du canal est également un site de fixation de plusieurs bloqueurs pharmacologiques comme les anesthésiques, les anti-arythmiques mais également la TTX. Il est situé au-dessus du pore du canal du côté extracellulaire, au niveau des quatre chaînes latérales Glu177 (sur chacun des domaines) positionnées au niveau de la boucle du segment S6 (Payandeh *et al.*, 2011).

Après s'être ouverts, les canaux sodiques s'inactivent. L'inactivation est caractérisée par le déplacement de la boucle intracellulaire située entre les domaines III et IV qui lorsque la cellule est dépolarisée, se loge à l'intérieur du canal (**Figure 1.8B**). L'interaction boucle-canal se fait via le motif IFM (Isoleucine, Phénylalanine et Méthionine) présent sur la boucle et qui se fixe grâce à des liaisons hydrogènes à l'intérieur du pore (West *et al.*, 1992).

L'activité du canal peut également être modulée par différentes protéines kinases (PKA et PKC). Ces kinases peuvent moduler le niveau d'expression, les propriétés biophysiques des canaux ainsi que l'amplitude du courant. Le canal sodique cardiaque possède 11 sites de phosphorylation dont 10 se situent au niveau de la boucle intracellulaire entre les domaines I et II et le dernier au niveau de l'extrémité N-terminale (Marionneau *et al.*, 2012). En revanche, le nombre de sites de phosphorylation au niveau des nNavs peut varier selon le canal. NaV1.2 possède 15 sites de phosphorylation (11 au niveau de la boucle intracellulaire entre les domaines I et II, 1 au niveau de l'extrémité N-terminale et 3 au niveau de l'extrémité C-terminale) tandis que NaV1.1 n'en possède que 3, tous situés au niveau de la boucle intracellulaire entre les domaines I et II (Berendt *et al.*, 2010). Il

s'avère donc que la boucle intracellulaire reliant les domaines I et II joue un rôle prépondérant dans la régulation des canaux sodiques.



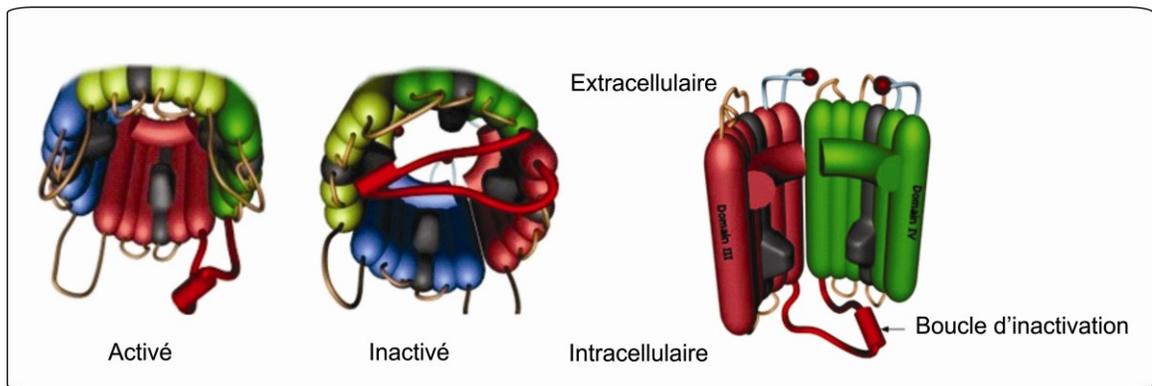
### Figure 1.8 Structure des canaux sodiques

**A)** Le canal sodique est composé de quatre domaines (I-IV). Chaque domaine est composé de 6 segments transmembranaires. Le segment S4 de chaque sous-unité  $\alpha$  est chargé positivement et est sensible au voltage. Les boucles intracellulaires entre les domaines I et II ainsi qu'entre les domaines III et IV correspondent respectivement aux sites de phosphorylations (représentation schématisée) et à la boucle d'inactivation du canal. Le pore du canal est formé par l'ensemble des boucles S5-S6. **B)** Représentation 3D d'un canal sodique. Le site de fixation des bloqueurs se trouve à l'extérieur du canal, tandis que le filtre de sélectivité se situe à l'intérieur (chaîne latérale Glu177). (A) Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ». (B)

Image modifiée et tirée du Pr Rajendra Dafal provenant d'une présentation intitulée 'Sodium channel modulators'.

## 1.7 Les différentes configurations des canaux sodiques

Les canaux sodiques sont donc voltage dépendant et possèdent plusieurs configurations permettant ou empêchant le passage des ions sodium. Les trois états de ces canaux sont : Fermé, Ouvert et Inactivé. Lorsque les canaux passent de l'état fermé à ouvert (lors d'une dépolarisation membranaire) on parle d'activation. Par la suite, lorsque les canaux passent de l'état ouvert à inactivé, on parle alors d'inactivation. Finalement, le retour des canaux de l'état fermé à partir des états inactivés correspond à la réactivation. Cette transition détermine le temps nécessaire aux canaux sodiques pour qu'ils puissent être de nouveau activables. Il est possible de mesurer et d'analyser ces différents paramètres (activation, inactivation et réactivation) à l'aide de la technique de patch clamp. La **figure 1.9** illustre les différentes conformations du canal ainsi que la boucle d'inactivation.



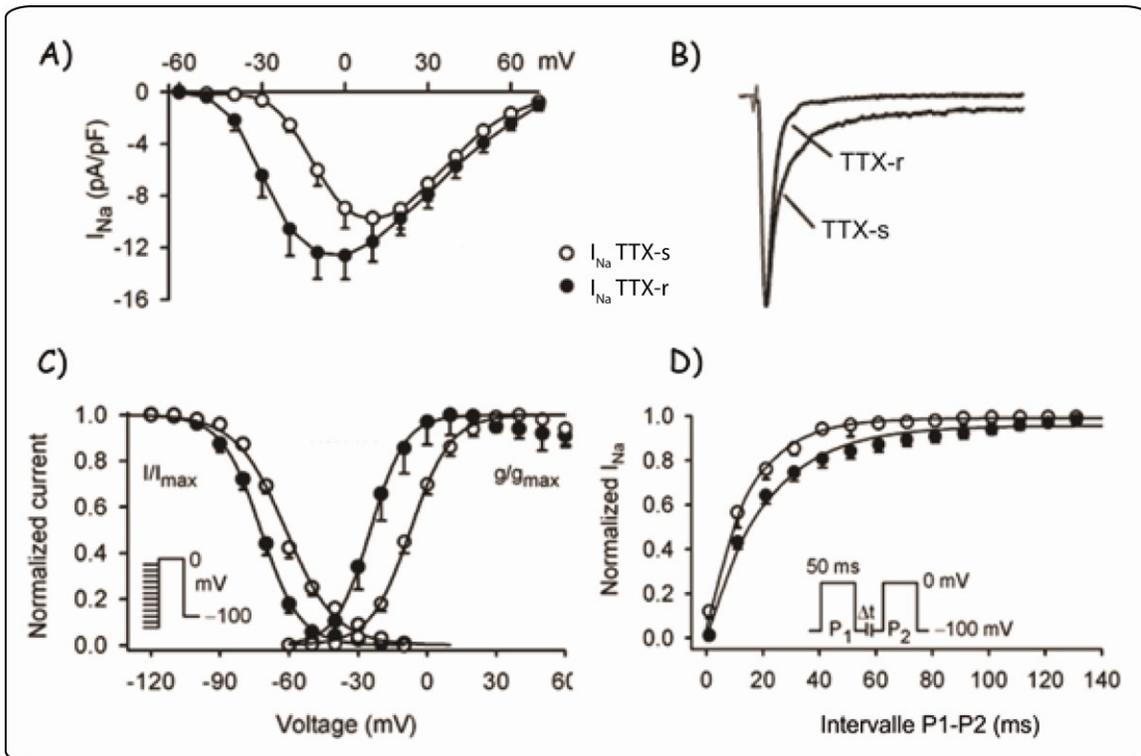
**Figure 1.9 Les différents états des canaux sodiques**

Le canal est activé lorsque les 4 segments S4 sont surélevés. L'inactivation du canal est un phénomène intracellulaire. La boucle d'inactivation située entre les domaines III et IV se déplace et vient boucher l'intérieur du canal. Au potentiel membranaire de repos, le canal est fermé (aucun segment S4 n'est élevé et la boucle d'inactivation non fixée). Image modifiée et tirée du Pr Rajendra Dafal provenant d'une présentation intitulée 'Sodium channel modulators'.

## 1.8 Propriétés biophysiques des canaux sodiques : comparaison entre NaV1.5 et les nNaVs

Les canaux sodiques NaV1.5 et les nNaVs n'ont donc pas la même sensibilité à la TTX et ne contribuent donc pas de la même façon aux différentes phases du courant sodique. Dans cette section, nous allons voir que les nNaVs ne possèdent pas les mêmes propriétés biophysiques que les canaux de type NaV1.5. La **figure 1.10** provient de l'étude de Li *et al.* (Li *et al.*, 2009) et résume les différentes propriétés biophysiques des canaux sodiques de type cardiaque (TTX-résistants; TTX-r) et de type neuronal (TTX-sensible; TTX-s). La **figure 1.10A** correspond à la relation courant voltage ( $I/V$ ). Elle représente la quantité de courant (nA) obtenu pour un potentiel appliqué donné (mV). On peut voir que le pic de courant et le seuil d'ouverture des canaux TTX-s sont déplacés de 10 mV vers des potentiels plus positifs. La **figure 1.10B** montre deux tracés de courants d' $I_{NaL}$  obtenus pour les canaux de types TTX-r et TTX-s. L'amplitude d' $I_{NaL}$  des canaux TTX-s est plus grande que celle des TTX-r. Cela vient du fait que les canaux TTX-r s'inactivent plus rapidement que les TTX-s. L'inactivation des canaux a été lissée avec une fonction mono-exponentielle et les constantes de temps d'inactivation ( $\tau$ ) obtenues sont de 1.82 ms et 4.3 ms respectivement pour les canaux TTX-r et TTX-s. La **figure 1.10C** correspond aux courbes d'activation (droite) et d'inactivation (gauche). La courbe d'inactivation peut être interprétée comme une courbe représentant la disponibilité des canaux où 1 correspond à 100% des canaux disponibles (aucune inactivation) et 0 à aucun canal disponible (tous inactivés). Les potentiels de demi-activation et d'inactivation ( $V_{1/2}$ ) correspondent à la valeur du potentiel appliqué pour laquelle la moitié des canaux sont respectivement activés et inactivés. Les valeurs des  $V_{1/2}$  d'activation sont de  $-24.7 \pm 1.4$  mV et  $-7.2 \pm 1.1$  mV respectivement pour les canaux TTX-r et TTX-s. Les valeurs des  $V_{1/2}$  d'inactivation sont de  $-72.3 \pm 1.5$  mV et  $-61.4 \pm 1.6$  mV respectivement pour les canaux TTX-r et TTX-s. Les canaux TTX-s possèdent donc un  $V_{1/2}$  d'activation et d'inactivation plus dépolarisés par rapport aux canaux TTX-r. Finalement, la **figure 1.10D** montre les courbes de réactivation des canaux TTX-r et TTX-s qui correspondent au temps de récupération des canaux à partir des états inactivés.

Elles sont obtenues suite à l'application de deux stimulations (P1-P2) de même intensité, séparées d'un intervalle de temps ( $\Delta T$ ) croissant. Elles représentent donc la proportion de canaux réactivés en fonction d'un l'intervalle de temps donné. Les canaux TTX-s se réactivent de façon plus rapide que les canaux TTX-r. En effet, les valeurs de constante de temps ( $\tau$ ) obtenues dans cette étude grâce à un lissage mono-exponentiel sont de  $21.4 \pm 2.9$  ms et de  $14.3 \pm 2.1$  ms respectivement pour les canaux TTX-r et TTX-s.



**Figure 1.10 Différences entre les propriétés biophysiques des canaux sodiques TTX-résistants (NaV1.5; ●) et TTX-sensibles (nNaVs; ○)**

**A)** Relations courants / potentiels. Le seuil d'activation ainsi que le pic de courant des nNaVs sont décalés vers des potentiels plus positifs comparativement à NaV1.5. **B)** Tracés représentatifs d' $I_{NaL}$  pour les différents types de canaux sodiques. L'amplitude d' $I_{NaL}$  des nNaVs est plus grande que celle des canaux NaV1.5. **C)** Courbes d'activation et inactivation. Les courbes d'activation et inactivation des nNaVs sont décalées vers des potentiels plus dépolarisés par rapport aux canaux NaV1.5. **D)** Courbes de réactivation. Les canaux sodiques de type nNaVs se réactivent plus rapidement que les canaux de type NaV1.5. Image tirée de Li *et al.*, PloS One, 2009.

En résumé, les canaux TTX-s s'activent et s'inactivent pour des potentiels plus dépolarisés (positifs) que les canaux TTX-r. L'amplitude d' $I_{NaL}$  est plus importante pour les canaux de type TTX-s et leur temps de réactivation est plus rapide comparativement aux canaux TTX-r.

En condition ischémique où le potentiel membranaire est dépolarisé, ces différences peuvent s'avérer intéressantes. En effet, le potentiel membranaire passe environ de -80 mV à -60 mV (Lukas et Antzelevitch, 1993), ce qui a pour conséquence de diminuer fortement la disponibilité des canaux NaV1.5. En revanche, à ce potentiel, environ 50% des nNaVs sont encore disponibles. Une surexpression des nNaVs en condition ischémique permettrait donc de maintenir la transmission de l'influx électrique grâce à leur plus grande disponibilité et à leur localisation. En revanche, cela entraînerait une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  ce qui augmenterait la DPA et l'intervalle QT.

### **1.9 La repolarisation ventriculaire : un phénomène hétérogène finement régulé**

Toutes les cellules cardiaques ne remplissent pas la même fonction. Selon leur rôle, le profil de canaux exprimés peut alors varier. Le PA étant le reflet des canaux qui y participent, leurs formes et leurs durées peuvent donc être différentes suivant leur localisation.

La **figure 1.11A** montre que la DPA est plus grande au niveau des ventricules comparativement aux oreillettes. Les deux principaux courants responsables de cette différence sont :  $I_{Kur}$  (ultra rapide) et  $I_{Ca}$ . En effet, le courant  $I_{Kur}$ , qui s'active deux fois plus vite que le courant  $I_{Kr}$ , est présent au niveau des oreillettes, mais pas des ventricules que ce soit chez le chien ou chez l'homme (Li *et al.*, 1996; Yue *et al.*, 2000). La repolarisation des oreillettes est donc plus rapide.

La **figure 1.11B** montre les différentes formes de PA présentes au niveau de la membrane ventriculaire. On peut s'apercevoir que la DPA varie selon la région de la paroi avec par ordre croissant de DPA : l'endocarde, l'épicarde et le

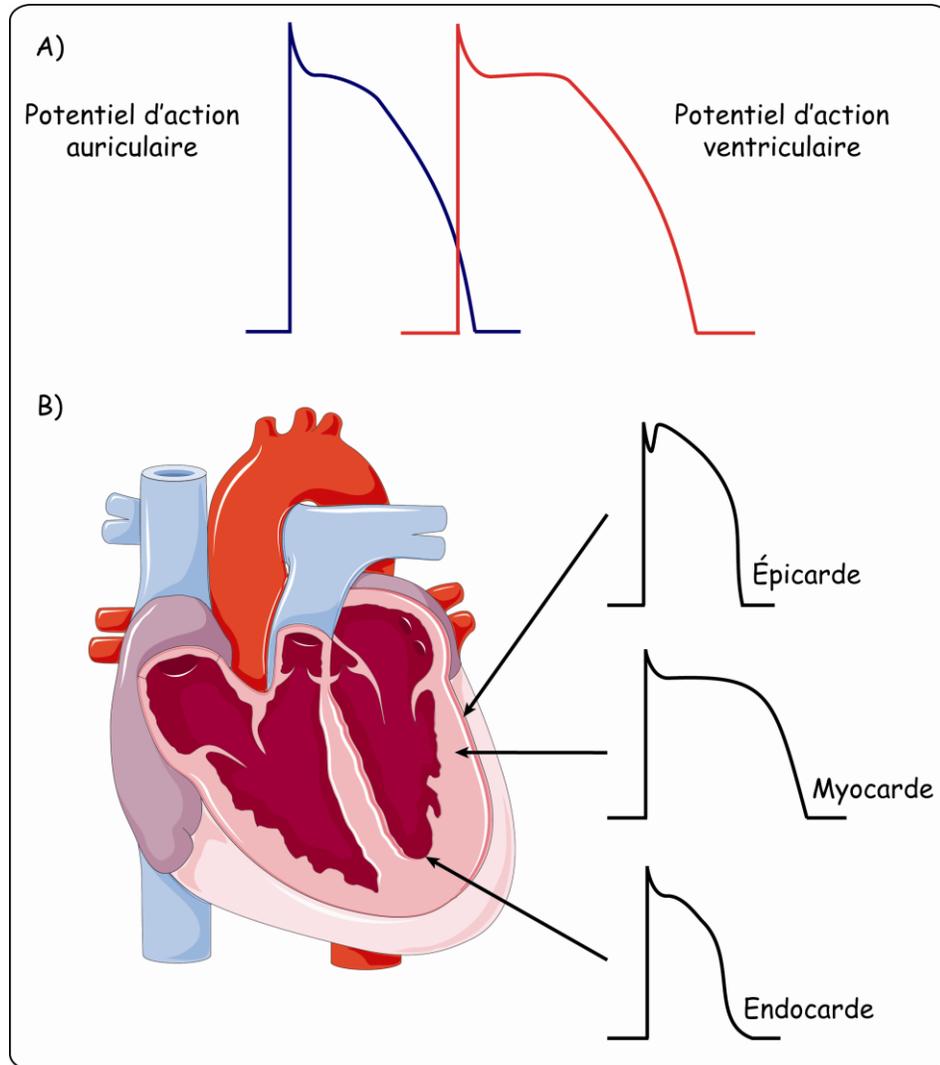
myocarde. Cela signifie donc que la repolarisation ventriculaire est un phénomène hétérogène où le myocarde se repolarise complètement en dernier. On parle alors de gradient de repolarisation transmural ventriculaire. Ces différences de DPA reflètent des différences d'amplitudes de certains courants, dont notamment :  $I_{to}$ ,  $I_{NaL}$ , et  $I_{Ks}$ . La présence d'une composante soutenue dépolarisante plus importante ( $I_{NaL}$ ) (Zygmunt *et al.*, 2001) et d'un courant repolarisant plus faible ( $I_{Ks}$ ) (Gintant, 1995; Liu et Antzelevitch, 1995) contribue à la plus grande durée de la DPA au niveau du myocarde.

L'hétérogénéité transmurale de la DPA est précisément réglée afin de synchroniser la contraction des ventricules et de permettre une activité cardiaque efficace. En conditions physiopathologiques, l'hétérogénéité naturelle de la DPA peut être modifiée et entraîner l'apparition d'arythmies cardiaque.

Le phénomène de réentrée est un exemple d'arythmie qui illustre bien la notion d'équilibre existant entre les différentes DPA de la paroi ventriculaire. Ces arythmies apparaissent en condition ischémique suite à une perte sélective du plateau des PA épocardiques. Lukas *et al.* (Lukas et Antzelevitch, 1993) ont montré sur des cardiomyocytes ventriculaires de chiens que l'ischémie entraînait une perte du plateau au niveau de l'épicarde et un raccourcissement de 50% à 60% de la DPA. Il se crée alors une différence de DPA entre l'épicarde et l'endocarde. L'épicarde se repolarise donc en premier ce qui augmente la dispersion transmurale de la repolarisation et la possibilité que des régions de l'épicarde déjà repolarisées soient de nouveau stimulées par l'endocarde.

Le phénomène de réentrée peut éventuellement être un des mécanismes arythmogènes associés à l'épilepsie. En effet, au niveau neuronal (nNavs), l'épilepsie est connue pour augmenter l'amplitude d' $I_{NaL}$  que ce soit à cause de mutations (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Cossette *et al.*, 2003; Kahlig *et al.*, 2006; Spanpanato *et al.*, 2001) ou chez des modèles d'animaux épileptiques (Chen *et al.*, 2011; French *et al.*, 1990). Cependant, aucune étude sur l'effet de l'épilepsie au niveau cardiaque n'a été faite. La présence de NaV1.1 au niveau des cellules ventriculaires, compte tenu de leur contribution à  $I_{NaL}$ , pourrait donc contribuer aux

déclenchements des arythmies cardiaques menant aux MSIE en modifiant l'hétérogénéité transmurale de la DPA.



**Figure 1.11 Les différents types de potentiels d'action cardiaques selon leur localisation**

**A)** Les PA auriculaires sont de plus courte durée comparativement aux PA ventriculaires.

**B)** Hétérogénéité de la DPA à travers la paroi ventriculaire. Les PA endocardiques sont les premiers à se repolariser et sont par conséquent de plus courte durée. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ».

## 1.10 Courant sodique et électrocardiogramme : rôle et contribution dans la genèse d'arythmies associées à l'ischémie et l'épilepsie

Nous avons vu que l'activité électrique cardiaque était finement réglée et que l'altération d'un seul paramètre (activation, inactivation, réactivation ou encore perte ou gain de fonction d'un canal) pouvait entraîner l'apparition d'arythmies létales. Il existe un outil permettant de mesurer de façon non invasive l'activité électrique globale du cœur et de déceler des anomalies du rythme : l'électrocardiogramme (ECG). Pour cela, des électrodes de surfaces sont placées au niveau de la main gauche et droite et de la jambe gauche. Les trois points déterminent le triangle d'Einthoven, inventeur de l'ECG. Cette technique permet d'obtenir une représentation graphique de l'activité électrique du cœur. La **figure 1.12** représente un tracé d'ECG classique obtenu en fonction du vecteur (sens de la dépolarisation) et associé aux différentes structures cardiaques. Le sens des ondes dépend du vecteur (axe) utilisé. La ligne plate correspond à la ligne isoélectrique. Elle ne présente aucune déflexion positive ou négative car selon cet axe, la somme nette est égale à zéro. C'est parce que cette ligne est parallèle avec le sens de la dépolarisation qu'elle apparaît horizontale sur les tracés. Au-dessus de cette ligne, on parle d'onde positive et en dessous, d'onde négative. Une onde peut également être biphasique si elle se situe en partie au-dessus et en dessous de la ligne isoélectrique. Une même onde peut donc être positive ou négative selon le vecteur utilisé.

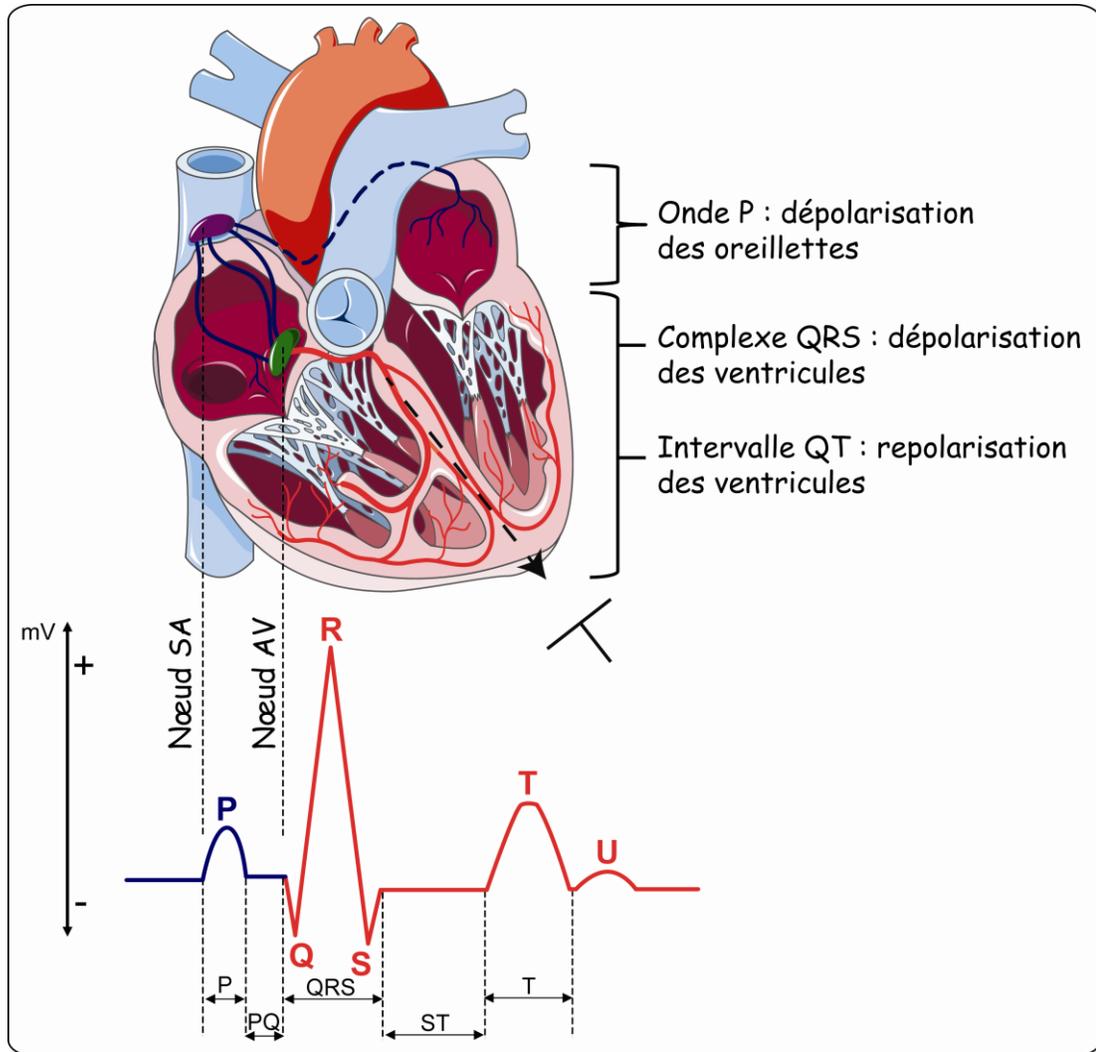
Un ECG peut se découper en 5 ondes : P Q R S T, chaque onde reflétant l'activité électrique d'une partie du cœur :

- L'onde P correspond à la dépolarisation (contraction) des oreillettes.
- L'intervalle PR correspond à la conduction auriculo-ventriculaire.
- Le complexe QRS correspond à la dépolarisation (contraction) des ventricules.
- L'intervalle QT correspond à la dépolarisation et repolarisation des ventricules.
- L'onde T correspond à la repolarisation des ventricules.

L'ECG peut donc nous permettre de connaître l'origine d'une anomalie cardiaque (problème de conduction, dépolarisation ou repolarisation), mais également sa localisation (oreillettes, ventricules ou nœuds). L'intervalle QT est d'ailleurs très souvent utilisé afin de déterminer si la repolarisation ventriculaire est normale. Par exemple, dans un cas de LQT3, l'allongement de l'intervalle QT signifie que la durée de la repolarisation ventriculaire est augmentée. Par la suite, plusieurs études ont permis de montrer que des mutations portant sur le gène SCN5A augmentaient l'amplitude d' $I_{NaL}$  entraînant alors un allongement de la DPA. Les problèmes concernant la repolarisation ventriculaire vont donc modifier la durée de l'intervalle QT. Il est connu que l'ischémie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Hale *et al.*, 2006; Shryock et Belardinelli, 2008). D'ailleurs il a été montré que l'utilisation d'un bloqueur d' $I_{NaL}$  (ranolazine) diminuait les dommages causés par l'ischémie et améliorait la fonction ventriculaire (Belardinelli *et al.*, 2006; Hale et Kloner, 2006; Hale *et al.*, 2006; Shryock et Belardinelli, 2008; Soliman *et al.*, 2012). L'augmentation d' $I_{NaL}$  entraîne donc une augmentation de la DPA ce qui retarde la repolarisation. Cela se traduit alors par un allongement de l'intervalle QT visible sur les ECG de patients ayant subi des épisodes ischémiques (Kenigsberg *et al.*, 2007).

L'épilepsie est également associée à un allongement de l'intervalle QT suivi parfois de bloc de conduction (BAV) (Nei *et al.*, 2000; Tigarán *et al.*, 2002) mais également à une augmentation d' $I_{NaL}$  au niveau neuronal (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Chen *et al.*, 2011; Cossette *et al.*, 2003; French *et al.*, 1990; Kahlig *et al.*, 2006; Spanpanato *et al.*, 2001). Ces anomalies du rythme cardiaque représentent d'ailleurs la principale cause de MSIE aux États-Unis et au Canada (Logroscino *et al.*, 2005). Même si la cause de cette anomalie demeure inconnue, elle est, par définition, nécessairement reliée à une dérégulation de la repolarisation ventriculaire (onde QT) et donc de la DPA. Puisque l'intervalle QT est dans ce cas-ci allongé, la DPA est augmentée. Les deux principaux facteurs déterminants la DPA sont la phase de plateau et la phase de repolarisation. L'épilepsie entraîne donc soit un allongement de la durée du plateau ( $I_{NaL}$ ) ou un retard dans la repolarisation. Il est intéressant de noter qu'une augmentation d' $I_{NaL}$  a été

observée au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe dans des modèles de rats épileptiques (Chen *et al.*, 2011; French *et al.*, 1990) et a été corrélée avec une augmentation d'expression de nNaVs (1.1, 1.2, 1.3 et 1.6) (Guo *et al.*, 2008, 2013; Xu *et al.*, 2013). Il n'existe donc pas encore de lien direct établi entre l'épilepsie et les arythmies cardiaques. En revanche, il est tentant de penser que si les modifications présentent au niveau neuronal se produisent également au niveau cardiaque, les conséquences sur  $I_{NaL}$  seraient identiques, à savoir une augmentation de son amplitude via une surexpression de nNaVs. Comme mentionné précédemment, nous avons montré chez des chiens contrôles la présence de nNaVs dans des cardiomyocytes ventriculaires et dans le système de conduction. La surexpression de nNaVs augmentant davantage  $I_{NaL}$  qu' $I_{Na}$  pic au niveau des cellules ventriculaires, cela entrainerait un allongement de la phase de plateau et donc de la DPA. Ce mécanisme pourrait être en partie à l'origine des QT long et BAV menant aux MSIE.



**Figure 1.12 Électrocardiogramme et activité électrique cardiaque**

La partie bleue du tracé représente l'activité électrique des oreillettes tandis que la partie rouge représente l'activité électrique des ventricules. La flèche en pointillé représente le sens de la dépolarisation cardiaque. Image réalisée à l'aide du programme « illustrator » et adaptée de « Servier Medical Arts ».

## **1.11 Rôle et implication du courant sodique en conditions physiopathologiques**

Cette section est divisée en quatre parties correspondant chacune à un projet différent : effets précoces d'un diabète de type 2 sur le cœur (chien), exposition *in-utero* à la nicotine (lapin), épilepsie (rats) et ischémie (chien). Chaque introduction est suivie de l'hypothèse et des objectifs de travail.

### **1.11.1 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans les insuffisances cardiaques liées au diabète**

Les données de l'étude de Framingham indiquent que le diabète augmente le risque de développer une insuffisance cardiaque congestive (ICC) par deux chez les hommes et par quatre chez les femmes (Levy *et al.*, 1996) ce qui en fait l'un des plus importants facteurs de risque dans le développement de l'ICC (Cook *et al.*, 2006, 2007). L'ICC apparaît lorsque le cœur pour différentes raisons (hypertension et ischémie) ne parvient plus à remplir pleinement sa fonction. En conséquence à l'augmentation de la pression artérielle, le cœur s'hypertrophie, mais les effets bénéfiques de cette adaptation du muscle cardiaque ne sont finalement que temporaires. La dysfonction cardiaque menant à l'ICC est principalement causée par des maladies cardiaques coronariennes et l'hypertension (Hayden et Reaven, 2000). Cependant, même en tenant compte des différents facteurs de risques et en l'absence d'hypertension ou de maladies coronariennes, les personnes diabétiques restent à un risque élevé d'insuffisance cardiaque indiquant que la dysfonction ventriculaire se développe chez ces patients en l'absence de troubles hémodynamiques (Fein et Sonnenblick, 1994; Regan *et al.*, 1977; Shehadeh et Regan, 1995). Ces observations suggèrent donc l'implication d'un autre mécanisme de dysfonctionnement cardio-vasculaire chez les individus diabétiques. De plus, ce dysfonctionnement induit par un diabète de type 2 (DT2) semble apparaître avant même que la résistance à l'insuline soit établie (Boudina et Abel, 2007). Le pré-diabète et le DT2 sont associés à un défaut d'absorption des acides gras (AG) alimentaires dans les tissus adipeux entraînant une augmentation de l'absorption des AG par le cœur. Ce phénomène est associé

à une dysfonction précoce de la contractilité myocardique (Carpentier, 2008; Labbé *et al.*, 2012; Ménard *et al.*, 2010). Les mécanismes sous-jacents menant à une dysfonction cardiaque suite à une surcharge lipidique demeurent néanmoins inconnus (Boudina et Abel, 2007). Les premières étapes de la cardiomyopathie diabétique (CD) sont caractérisées par une diminution de la contractilité, un ralentissement de la diastole et une hypertrophie ventriculaire. Par la suite, le développement de l'insuffisance cardiaque entraîne une diminution de l'efficacité de la systole (Belke et Dillmann, 2004; Belke *et al.*, 2004). Des anomalies liées au transport de calcium, mais sans changements durables des concentrations intracellulaires (Yu *et al.*, 1997) ont été observées chez les patients atteints de CD (Tahiliani et McNeill, 1986) et peuvent expliquer en partie les observations cliniques. De plus, les CD sont également caractérisées par un remodelage électrique des ventricules (Casis *et al.*, 2000; Fein *et al.*, 1980; Regan *et al.*, 1977; Shehadeh et Regan, 1995; Tahiliani et McNeill, 1986) ce qui contribue vraisemblablement à l'augmentation de l'incidence des arythmies et des morts subites survenant dans cette population de patients. Les CD semblent donc associées à un remodelage électrique précoce et à un changement dans la régulation intracellulaire de calcium.

Le courant sodique cardiaque ( $I_{Na}$ ) est un candidat intéressant pour expliquer à la fois les perturbations électriques, mais aussi les problèmes de régulation de calcium intracellulaire apparaissant au tout début du développement du DT2 et des CD. En effet, le courant  $I_{Na}$  détermine l'excitabilité cardiaque et module la repolarisation ventriculaire (Dumaine et Antzelevitch, 2002). Par ailleurs, le courant de fenêtre sodique ( $I_{Na, w}$ ) régule la concentration de sodium intracellulaire et peut moduler la relaxation diastolique en modifiant le sens de fonctionnement de l'échangeur sodium-calcium (NCX). Le courant  $I_{Na, w}$  correspond à la région délimitée par la superposition des courbes d'activation et d'inactivation. Dans cette région, la population de canaux s'équilibre entre différents états (ouverts, fermés et inactivés) ce qui entraîne la présence d'un courant sodique dépolarisant dit de fuite. Lorsque la concentration de sodium intracellulaire devient trop élevée, le mode de fonctionnement de l'échangeur NCX

s'inverse et expulse trois ions sodium contre l'entrée d'un ion calcium, entraînant alors une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium pendant la diastole.

Sachant que les CD sont responsables d'une surexposition du cœur aux AG et entraînent un remodelage électrique des ventricules, nous avons voulu déterminer *in vivo* les effets d'une augmentation des AG libres sur le courant sodique cardiaque. Pour cela, nous avons perfusé par voie intraveineuse chez le chien une solution riche en AG non estérifiés (AGNE). Ce modèle nous a donc permis de mesurer pour la première fois *in vivo* les effets d'une hyper-lipidémie sur le courant  $I_{Na}$  cardiaque. L'hypothèse testée fut donc la suivante : est-ce qu'une augmentation du taux d'AGNE libres chez le chien peut modifier les propriétés biophysiques des canaux sodiques et être à l'origine d'un remodelage électrique au niveau cardiaque? Le chien a été choisi comme modèle animal pour plusieurs raisons : d'une part, il s'agit d'un modèle ayant des propriétés électrophysiologiques cardiaque très proches de celles de l'homme et son important volume sanguin nous a permis de prélever un grand nombre d'échantillons (Chiu *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2002; Everett-Grueter *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2004). Nos résultats indiquent qu'une infusion aiguë (8 heures) d'intra-lipide et d'héparine était suffisante pour induire un remodelage d' $I_{Na}$ . Les modifications que nous avons observées concordent avec les problèmes d'excitabilité et l'augmentation de calcium intracellulaire observée chez des personnes atteintes de CD.

### **Hypothèse et objectifs de travail :**

Malgré l'absence de malformation, le diabète est responsable d'insuffisances cardiaques pouvant entraîner la mort du patient. L'origine de ces insuffisances semble être due à un remodelage ionique des ventricules et à un problème de régulation du calcium. Les canaux sodiques sont responsables de la dépolarisation et peuvent être impliqués dans la régulation du calcium intracellulaire (courant de fenêtre) en modulant notamment le sens de fonctionnement de l'échangeur NCX. Notre objectif est donc de déterminer les

effets précoces d'une surcharge en acides gras sur les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques. Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de répondre aux deux objectifs suivants :

### **1) Développer un modèle animal mimant les effets précoces d'un DT2**

Le DT2 est caractérisé par un défaut d'absorption des AG entraînant une augmentation des AG au niveau cardiaque. Afin de mimer ces modifications précoces, nous avons perfusé pendant huit heures un mélange d'AG-héparine chez le chien. Le stress pouvant moduler le métabolisme des AG, nous avons également mesuré les taux plasmatiques d'ACTH et de cortisol.

### **2) Déterminer les effets d'une augmentation systémique d'AGNE sur les propriétés électrophysiologiques d'I<sub>Na</sub>**

Les CD sont caractérisées par des insuffisances cardiaques et des problèmes de contractions. Le courant sodique étant impliqué dans la dépolarisation, la régulation du calcium intracellulaire ainsi que dans la conduction, nous avons analysé les effets précoces d'une surcharge lipidique sur ses propriétés électrophysiologiques. Pour cela, nous avons mesuré l'amplitude maximale du courant sodique, son seuil d'activation, mais également ses propriétés d'activation, d'inactivation et de réactivation. Afin de déterminer si une augmentation d'AG circulants pouvait modifier la régulation intracellulaire en calcium, nous avons analysé l'amplitude du courant de fenêtre en condition sham et traités.

#### **1.11.2 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans le syndrome de mort subite du nouveau-né (SMSN) lié au tabagisme**

Le SMSN correspond au décès soudain et inexplicable de nouveau-nés âgés de moins d'un an pendant leur sommeil, sans aucun signe extérieur de détresse ni d'antécédents médicaux (Hunt et Hauck, 2006). Les nouveau-nés, pourtant dépourvus de toutes anomalies de développement (cœur et autres organes), s'arrêtent spontanément de respirer durant leur sommeil, entraînant alors le décès du nourrisson. L'incidence de ce syndrome est de 0.3 à 0.6 nourrisson pour 1000

naissances au Canada et il est responsable de 50% des décès de nouveau-nés intervenant durant le sommeil en Amérique du Nord (Thuot *et al.*, 2001). Le SMSN est donc défini par la mort inexplicée d'un nourrisson apparemment sain durant la première année (Matturri *et al.*, 2000). Le tabagisme durant la grossesse (exposition pré et post-natale) est aujourd'hui considéré comme la principale cause du SMSN (Sartiani *et al.*, 2010). En effet, une exposition prénatale à la nicotine augmente de deux à quatre fois le risque de SMSN (Haglund et Cnattingius, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). Une étude épidémiologique menée par Shah *et al.* en 2006 a montré que le tabagisme maternel était responsable de 21% et 61% des cas de SMSN respectivement au sein d'une population mixte et fumeur uniquement (Shah *et al.*, 2006). Bien qu'il soit aujourd'hui impossible de prédire le SMSN, plusieurs observations ont permis de révéler certaines anomalies cardiaques de la maladie. En effet, Neff *et al.* (Neff *et al.*, 2004) ont montré qu'une exposition *in-utero* à la nicotine chez le rat facilitait le développement d'apnées du sommeil comparativement aux animaux contrôles. De plus, les animaux traités présentaient une plus faible tolérance à l'hypoxie, ceci s'expliquant notamment par une déficience dans la régulation du rythme cardiaque. L'hypoxie entraîne donc le développement d'une bradycardie sévère chez les nouveau-nés atteints du SMSN. L'incapacité pour ces derniers à augmenter leur rythme cardiaque semble être une des principales causes de SMSN (Slotkin *et al.*, 1997).

Les nourrissons atteints de SMSN sont également victimes d'apnées prolongées durant leur sommeil et développent une bradycardie ayant pour origine probable un dysfonctionnement du système de conduction cardiaque et du système nerveux autonome (Ottaviani, 2011). En revanche, lorsqu'ils font des apnées du sommeil, les enfants sains sont capables de se réveiller brusquement suite à l'activation du système sympatho-adrénergique, entraînant ainsi une accélération du rythme cardiaque que l'on appelle réflexe d'auto-réanimation (AR). En temps normal, l'organisme détecte cet état de sous-oxygénation et augmente transitoirement les fréquences cardiaque et respiratoire (réflexe d'AR). L'hypoxie détectée au niveau des centres respiratoires va entraîner le déclenchement d'une stimulation adrénérergique afin d'accélérer la fréquence cardiaque. Cette 'décharge

adrénergique' est responsable du réveil du nourrisson et semble absente chez les nourrissons exposés *in-utero* à la nicotine. Afin d'expliquer pourquoi les nourrissons atteints de SMSN ne peuvent pas 'sortir' de leur apnée du sommeil, deux hypothèses ont alors émergé : la présence d'un dysfonctionnement au niveau des muscles respiratoires ou au niveau du système de conduction cardiaque (Huang *et al.*, 2006). Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes donc intéressés à la deuxième hypothèse. Parce qu'il détermine l'excitabilité et est impliqué dans la génération et la conduction de l'influx électrique cardiaque, le courant sodique semble donc être un bon candidat afin d'expliquer l'absence d'accélération du rythme cardiaque chez les enfants souffrant de SMSN. De plus, les propriétés biophysiques ainsi que l'expression des canaux sodiques sont modulées par une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Schreibmayer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Hallaq *et al.*, 2006, 2012).

Le système responsable d'accélérer le rythme cardiaque est le système sympathique qui via l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques permet d'augmenter le niveau d'expression des canaux sodiques et par conséquent la densité de courant (Yarbrough *et al.*, 2002). À ce propos, Navarro (Navarro *et al.*, 1990) a montré que l'exposition *in-utero* à la nicotine retardait sur le long terme, le développement des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques chez le rat. Il se peut alors que les cœurs des enfants atteints du SMSN ne répondent plus aux stimulations adrénérergiques, expliquant ainsi l'absence de réflexe d'AR et d'accélération de la fréquence cardiaque. Notre hypothèse est donc la suivante : Est-ce qu'un défaut dans la réponse adrénérergique au niveau cardiaque peut être à l'origine de l'absence de réflexe d'AR chez les enfants atteints de SMSN? Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques au niveau de l'oreillette droite chez des lapins nouveau-nés de 37 jours exposés *in-utero* ou non à la nicotine. Nos résultats indiquent qu'une exposition *in-utero* à la nicotine entraîne un remodelage ionique et une désensibilisation des canaux sodiques en réponse à 10  $\mu$ M d'isoprotérénol. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Navarro *et al.* (1990) puisqu'ils montrent qu'une exposition *in-utero* à la nicotine abolit de façon durable les effets d'une stimulation

adrénergique sur le courant sodique cardiaque. Nos résultats appuient également notre hypothèse de travail selon laquelle l'absence de réflexe d'AR et donc d'accélération du rythme cardiaque serait due à un défaut dans la réponse adrénergique au niveau du courant sodique cardiaque.

### **Hypothèse et objectif de travail :**

Les nouveau-nés atteints du SMSN ont la particularité de ne pas avoir de réflexe d'AR et meurent d'apnées prolongées durant leur sommeil. Les observations et données collectées laissent penser que le cœur ne répond plus normalement à une décharge adrénergique, censée augmenter le rythme cardiaque et réveiller le nourrisson. Navarro *et al.* (1990) ont montré qu'une exposition *in-utero* à la nicotine pouvait retarder le développement des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui sont le vecteur indispensable de la décharge adrénergique. Les canaux sodiques sont responsables de la dépolarisation et de l'excitabilité cardiaque et sont également les médiateurs de la stimulation adrénergiques. Dans cette étude, nous avons donc étudié l'effet d'une exposition à la nicotine sur les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques. Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de répondre aux deux objectifs suivants :

#### **1) Déterminer les effets d'une exposition *in-utero* à la nicotine chez le lapin nouveau-né de 37 jours sur les propriétés biophysiques d' $I_{Na}$**

Le SMSN est caractérisé par l'absence de réflexe d'auto-réanimation. Cette défaillance peut provenir des muscles respiratoires et/ou du muscle cardiaque. Afin de vérifier l'hypothèse d'une défaillance cardiaque, nous avons analysé les effets d'une exposition *in-utero* à la nicotine chez le lapin. Pour cela, nous avons mesuré l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ , le seuil d'activation ainsi que les propriétés d'activation et inactivation pour les animaux sham et exposés à la nicotine.

#### **2) Déterminer les effets d'une stimulation adrénergique sur le courant sodique cardiaque**

L'absence de réponse à une stimulation adrénérgique semble être à l'origine de l'absence de réflexe d'AR. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les effets de 10  $\mu\text{M}$  d'isoprotérénol (agoniste des récepteurs  $\beta$ ) sur l'amplitude maximale d' $I_{\text{Na}}$ , le seuil d'activation ainsi que sur les paramètres d'activation et inactivation.

### **1.11.3 Rôle et implication du courant sodique cardiaque dans l'épilepsie**

L'épilepsie est une pathologie neurologique définie par la survenue d'ictus caractérisés par une hyperactivité cérébrale non coordonnée. L'origine de ces crises provient du dysfonctionnement d'une population de neurones (crises partielles) ou des deux hémisphères (crise généralisée). Cependant, aux États-Unis et au Canada, entre 21% et 22% des patients épileptiques décèdent de MSIE suite à un problème cardiaque (Logroscino *et al.*, 2005). Les MSIE sont la principale cause de décès chez les personnes épileptiques et elles sont caractérisées par la présence d'arythmies cardiaques telles que des torsades de pointes ou un allongement de l'intervalle QT, mais les mécanismes physiologiques sont encore inconnus.

Au niveau neuronal, plusieurs mutations liées à l'épilepsie ont été découvertes sur les gènes SCN1A et 2A codant respectivement pour NaV1.1 et NaV1.2. Le principal effet de ces mutations est d'augmenter l'amplitude d' $I_{\text{NaL}}$  (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Cossette *et al.*, 2003; Kahlig *et al.*, 2006; Spanpanato *et al.*, 2001). D'autres mutations faux-sens sur NaV1.1 et 1.2 ont été reliées à des formes héréditaires d'épilepsie. Ces mutations augmentent l'amplitude d' $I_{\text{NaL}}$  et l'excitabilité au niveau des cellules neuronales (Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999; Lossin *et al.*, 2002; Sugawara *et al.*, 2001a, 2001b). L'augmentation d'une composante dépolarisante à certains endroits du cerveau va donc créer des zones d'hyperexcitabilité, responsables des ictus. Cependant, la majorité des personnes atteintes d'épilepsie ne présente pas de mutation et décède néanmoins de MSIE. Plusieurs modèles animaux ont ainsi été développés afin d'étudier les effets de

l'épilepsie en absence de mutation. Ces études ont permis de montrer que même en absence de mutation, l'épilepsie induit une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe (Chen *et al.*, 2011; French *et al.*, 1990) et que cette augmentation peut être attribuée à une surexpression des nNavs (1.1, 1.2, 1.3 et 1.6) (Guo *et al.*, 2008, 2013; Xu *et al.*, 2013).

Au niveau cardiaque, des ECG de patients en pleine crise d'épilepsie montrent tout d'abord une accélération du rythme cardiaque (tachycardie) suivie ensuite d'une forte bradycardie pouvant mener dans certains cas à l'apparition de troubles de conduction (allongement du segment QT) et de BAV (Nei *et al.*, 2000; Tigarán *et al.*, 2002). Les anomalies sur les ECG sont présentes dans 35% des crises généralisées et une élévation du segment ST ainsi qu'une inversion de l'onde T peuvent être observées dans 6% à 13% des cas (Nei *et al.*, 2000, 2004; Opherk *et al.*, 2002). Pendant, ou peu de temps après, la crise d'épilepsie, plusieurs phénomènes arythmogènes apparaissent alors : BAV, fibrillation auriculaire, tachycardie supraventriculaire, dépolarisation ventriculaire prématurée et bloc de branche (His) (Nei *et al.*, 2000; Tigarán *et al.*, 2002). Chaque année, dans 9.3 des cas sur 1000, les morts attribuables aux MSIE sont dues au développement d'arythmies liées à un allongement de l'intervalle QT survenant environ 30 minutes après une crise (Dasheiff, 1991; Dasheiff et Dickinson, 1986). L'intervalle QT est également prolongé chez les patients épileptiques dépourvus de mutations sur le gène SCN5A (NaV1.5) (Christidis *et al.*, 2006). De plus, la modification de la durée de l'intervalle QT, qui est un indice de risque de troubles du rythme cardiaque, est significativement plus importante chez les enfants épileptiques (Akalín *et al.*, 2003). La combinaison de ces types d'arythmies suggère fortement l'implication du courant sodique  $I_{Na}$ . En effet, le courant sodique pic détermine l'excitabilité, la composante soutenue ( $I_{NaL}$ ) module la DPA, et la disponibilité ainsi que la réactivation modulent principalement la conduction.

De plus, l'épilepsie est associée à une perturbation du tonus sympatho-vagal. Deux grands systèmes aux effets opposés régulent l'activité cardiaque : le système sympathique et le système parasympathique. Le système sympathique

(adrénaline) est dit cardio-accélérateur tandis que le système parasympathique (acétylcholine) est dit cardio-modérateur. Ces systèmes sont constitués d'un centre nerveux bulbaire situé au bas du cerveau (liaison cerveau-moelle épinière) et d'un réseau de nerfs permettant le transfert de l'information. Des observations cliniques ont permis de montrer que des crises répétées peuvent chroniquement entraîner un remodelage du système autonome vers une dominance sympathique (Ansakorpi *et al.*, 2000; Devinsky *et al.*, 1994; Isojärvi *et al.*, 1998; Naritoku *et al.*, 2003). L'exposition chronique du cœur à des niveaux élevés d'adrénaline est bien connue pour induire un remodelage électrique et mécanique ainsi qu'une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques lors de cardiomyopathies (Ansakorpi *et al.*, 2000; Devinsky *et al.*, 1994; Isojärvi *et al.*, 1998; Naritoku *et al.*, 2003). Ces observations soutiennent l'hypothèse que des modifications du contrôle central (cerveau) sur le tonus sympatho-vagal provoquent des arythmies cardiaques pendant une crise d'épilepsie (Ansakorpi *et al.*, 2000; Devinsky *et al.*, 1994; Isojärvi *et al.*, 1998; Naritoku *et al.*, 2003). Elles soutiennent également l'hypothèse de l'implication du courant sodique dans la génération de ces arythmies. En effet, une stimulation adrénergique (activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) augmente l'amplitude et l'expression des canaux sodiques au niveau cardiaque (Yarbrough *et al.*, 2002). L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entraîne alors l'activation des protéines kinases A et C qui sont également impliqués dans la modulation du niveau d'expression des canaux sodiques. En effet, l'activation de la PKC diminue le niveau d'expression de SCN5A, tandis que l'activation de la PKA l'augmente (Schreibmayer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Hallaq *et al.*, 2006, 2012). L'allongement de l'intervalle QT, les BAV, la présence de mutations ou de surexpression de canaux sodiques (nNavs) et la modification du tonus sympatho-vagal lors des crises suggèrent fortement qu' $I_{Na}$  est impliqué dans les MSIE. Au regard de ces observations, il est d'ailleurs étonnant de constater qu'aucune étude ne se soit intéressée aux effets de l'épilepsie sur les propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques au niveau cardiaque.

Il est toutefois important de noter que le profil d'expression des canaux sodiques au sein des neurones est différent de celui des cardiomyocytes. En effet, le courant sodique neuronal est généré par les nNaVs, tandis qu'au niveau cardiaque, il est majoritairement généré par NaV1.5. Cependant, il existe au niveau cardiaque deux types de courants sodiques que l'on peut distinguer selon leur affinité à la TTX (Coraboeuf *et al.*, 1979; Saint *et al.*, 1992). Les auteurs ont montré qu'il existait une composante soutenue du courant sodique au niveau cardiaque et qu'une faible quantité de TTX pouvait diminuer la DPA. Notre laboratoire a par la suite démontré que des nNaVs (notamment NaV1.1 et 1.2) étaient bien exprimés au niveau des ventricules chez le chien et qu'ils participaient davantage à  $I_{NaL}$  qu'à  $I_{Na}$  pic (Biet *et al.*, 2012; Haufe *et al.*, 2005a, 2005b). Ces observations corroborent avec les propriétés biophysiques des différents types de canaux (**Figure 1.10**)

À partir de toutes ces observations cliniques et fondamentales au sujet de l'épilepsie et des MSIE, il est tentant de penser que les modifications présentes au niveau neuronal (augmentation d' $I_{NaL}$  et surexpression des nNaVs) soient également présentes au niveau cardiaque. L'allongement de l'intervalle QT observé chez les patients épileptiques pourrait alors s'expliquer par une surexpression des nNaVs au niveau cardiaque ce qui augmenterait l'amplitude d' $I_{NaL}$  et donc la DPA. En plus d'une possible surexpression des nNaVs, les perturbations du tonus sympatho-vagal (tachycardie lors de l'ictus suivi d'une forte bradycardie pouvant mener à des BAV) peuvent également contribuer au développement des arythmies cardiaques liées à l'épilepsie en modifiant l'expression de NaV1.5 (Schreibmayer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Hallaq *et al.*, 2006, 2012) et l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Ma *et al.*, 2012). Le courant sodique (NaV1.5 et nNaVs) est donc un bon candidat pour expliquer les problèmes d'hyperexcitabilité, de conduction et de repolarisation ventriculaire chez les personnes épileptiques.

Afin de déterminer les effets de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques, nous avons utilisé un modèle de rats présentant un *status*

*epilepticus* (SE). Nos résultats montrent que l'épilepsie a augmenté l'excitabilité cardiaque, l'amplitude d' $I_{NaL}$  et altéré la régulation adrénérgique ainsi que l'activité des protéines kinases C et A, ce qui concorde avec les observations faites chez les patients épileptiques.

### **Hypothèse et objectif de travail :**

L'épilepsie augmente l'excitabilité neuronale et entraîne l'apparition de crises en modifiant les paramètres biophysiques et l'expression des nNavs au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe. Cependant, l'épilepsie est également responsable de MSIE ayant pour origine l'apparition de bradycardie suivie parfois de BAV. Les nNavs étant exprimés au niveau cardiaque, nous avons voulu déterminer si une modification de la repolarisation cardiaque suite à l'altération des propriétés biophysiques de NaV1.5 et/ou des nNavs par l'épilepsie pouvait expliquer en partie le développement des arythmies cardiaques liées aux MSIE. Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de répondre aux quatre objectifs suivants :

#### **1) Déterminer l'effet de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques cardiaque**

L'épilepsie entraîne une augmentation de l'excitabilité au niveau neuronal et modifie le niveau d'expression de plusieurs canaux. Afin de vérifier si l'épilepsie module de la même façon les propriétés biophysiques des canaux sodiques au niveau cardiaque, nous avons mesuré l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ , le seuil d'activation ainsi que les paramètres d'activation, d'inactivation et de réactivation.

#### **2) Déterminer l'effet de l'épilepsie sur $I_{NaL}$ au niveau cardiaque**

L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  au niveau neuronal. Cette augmentation est présente en cas de mutation, mais également dans des modèles d'animaux épileptiques. Afin de déterminer si l'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  au niveau cardiaque, nous avons mesuré son amplitude en utilisant différentes

concentrations de TTX dans le but de déterminer le taux de participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{NaL}$ .

### **3) Déterminer l'effet de l'épilepsie sur la réponse adrénergique**

Beaucoup d'études et de rapports médicaux mentionnent l'apparition de troubles du rythme cardiaque durant les crises et post-ictus (bradycardie, BAV) (Christidis *et al.*, 2006; Dasheiff, 1991; Dasheiff et Dickinson, 1986; Nei *et al.*, 2000, 2004; Opherk *et al.*, 2002; Tigarán *et al.*, 2002). Le rythme cardiaque étant déterminé par le système sympatho-vagal, il semble donc que l'activité de ce dernier soit modifiée par l'épilepsie. Comme mentionné précédemment, le courant sodique est fortement régulé par ce système. Le développement des bradycardies menant aux BAV nous indique que le système parasympathique domine sur le sympathique. Afin de vérifier si l'épilepsie modifie la réponse adrénergique, nous avons mesuré l'effet de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol sur l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ , le seuil d'activation ainsi que les paramètres d'activation, d'inactivation et de réactivation.

### **4) Déterminer l'effet de l'épilepsie sur l'activité de la PKC et de la PKA**

Comme mentionné précédemment, l'activité des protéines kinases A et C est régie par le système sympatho-vagal et module l'expression et les propriétés biophysiques des canaux sodiques. Leur activation et inactivation interviennent lors d'une stimulation adrénergique ou muscarinique. Puisque le rythme cardiaque varie énormément pendant une crise d'épilepsie, nous avons voulu vérifier si l'épilepsie modifiait la modulation du courant sodique cardiaque par la PKA et PKC. Afin d'analyser l'effet de l'épilepsie sur l'activité de PKA et PKC, nous avons utilisé deux inhibiteurs (chélérythrine pour la PKC et H-89 pour la PKA) dans le but d'évaluer l'impact de ces protéines kinase sur le courant sodique pour les conditions sham et épileptique.

#### **1.11.4 Rôle et implication du courant sodique cardiaque en condition ischémique**

L'ischémie correspond à une diminution de la circulation sanguine d'une région du tissu cardiaque qui provient de l'obstruction d'un ou plusieurs vaisseaux coronariens suite au développement de plaques d'athérosclérose ou de caillots sanguins. Le sang ne peut alors plus circuler et permettre l'oxygénation du tissu. L'hypoxie va par la suite être responsable de changements électrophysiologiques au niveau cardiaque dont notamment une dépolarisation du potentiel membranaire. Au niveau cellulaire, l'hypoxie entraîne une diminution de l'ATP. Cette baisse d'ATP intracellulaire va avoir pour conséquence de diminuer l'activité des transporteurs membranaires consommateurs d'énergie, comme la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-ase qui normalement expulse trois ions sodium en dehors de la cellule contre l'entrée de deux ions potassium. Cette pompe est dite électro-génique puisqu'elle génère un courant hyperpolarisant (sortie nette d'une charge positive). La baisse de son activité entraîne donc, de par la perte d'un courant hyperpolarisant, une dépolarisation membranaire. De plus, cette pompe régule les concentrations intra- et extracellulaire des ions sodium et potassium. Lorsque la pompe n'a plus assez d'énergie pour fonctionner, le potassium ne peut plus être pompé de nouveau dans la cellule. La concentration en ions  $\text{K}^+$  va donc augmenter du côté extracellulaire et diminuer du côté intracellulaire. Selon l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz, cela va engendrer une dépolarisation du potentiel membranaire. La baisse d'ATP va également déclencher l'ouverture des canaux  $\text{I}_{\text{K}_{\text{ATP}}}$ . La sortie d'ions  $\text{K}^+$  peut initialement entraîner une hyperpolarisation, mais une trop forte sortie d'ions potassium peut par la suite conduire à une augmentation de la concentration extracellulaire en ions  $\text{K}^+$  et dépolariser la membrane. Cette dépolarisation membranaire va avoir pour conséquence d'inactiver les canaux sodiques (forte baisse de la disponibilité des canaux  $\text{NaV1.5}$ ) et de freiner le déclenchement des PA en diminuant l'excitabilité. Cela entraîne donc une diminution de la vitesse de conduction. La dépolarisation membranaire ainsi que la diminution de la vitesse de conduction sont des facteurs propices au développement d'arythmies cardiaques.

L'ischémie est d'ailleurs responsable de plusieurs troubles du rythme cardiaque tels que des fibrillations auriculaires, des tachycardies ventriculaires, des torsades de pointes et des phénomènes de réentrées (Tatli *et al.*, 2013). Plusieurs études et rapports démontrent l'implication du courant  $I_{NaL}$  dans la génération des phénomènes arythmogènes liés à l'ischémie (Belardinelli *et al.*, 2013; Shryock et Belardinelli, 2008; Soliman *et al.*, 2012). Dans ces études, les auteurs montrent que l'inhibition du courant  $I_{NaL}$  avec de la ranolazine entre autres permettait de diminuer les dommages liés à l'ischémie. De plus, il a été démontré que l'amplitude d' $I_{NaL}$  était augmentée en condition d'hypoxie, (Ju *et al.*, 1996) mais également dans des conditions d'insuffisance cardiaque (Undrovinas *et al.*, 1999) respectivement sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat et de chien. L'augmentation d' $I_{NaL}$  est en accord avec les observations cliniques montrant une augmentation précoce de la durée de l'intervalle QT chez des patients atteints d'ischémie ventriculaire transmurale (Kenigsberg *et al.*, 2007). En effet,  $I_{NaL}$  joue un rôle important dans la détermination de la DPA (Kiyosue et Arita, 1989) et de la concentration intracellulaire en sodium (Ju *et al.*, 1996; Saint, 2006). L'augmentation d' $I_{NaL}$  en condition d'hypoxie a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire en sodium ( $[Na^+]_i$ ). Suite à l'augmentation du  $[Na^+]_i$ , le mode de fonctionnement de l'échangeur NCX qui en temps normal expulse un ion calcium contre l'entrée de trois ions sodium s'inverse ce qui engendre une entrée d'ions calcium contribuant à l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ . La surcharge calcique est donc un phénomène sodium dépendant (lié à l'augmentation du sodium intracellulaire) dû à l'augmentation d' $I_{NaL}$  (Hammarström et Gage, 2002; Tang *et al.*, 2012) et peut être à l'origine d'arythmies cardiaques et de dégâts cellulaires irréversibles (Richardt et Tölg, 1997). De plus, l'augmentation d' $I_{NaL}$  est également associée à des troubles du rythme et de contractilité (Song *et al.*, 2006; Undrovinas et Maltsev, 2008). C'est pourquoi l'inhibition d' $I_{NaL}$ , avec de la ranolazine par exemple, est considérée aujourd'hui comme une cible thérapeutique potentielle chez les patients souffrant d'ischémie et d'insuffisance cardiaque (Belardinelli *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006).

Notre laboratoire a démontré au niveau cardiaque que le courant  $I_{NaL}$  était généré à 50% par des canaux sodiques de type non cardiaque (Biet *et al.*, 2012) et que des nNaVs étaient exprimés (Haufe *et al.*, 2005a, 2005b). De plus, ces nNaVs sont principalement exprimés au niveau des disques intercalaires, qui sont des régions spécialisées dans la transmission de l'influx électrique (Haufe *et al.*, 2005b). Sachant que l'ischémie dépolarise le potentiel membranaire et diminue la conduction de l'influx électrique, une augmentation de la contribution des nNaVs, de par leur disponibilité plus élevée que NaV1.5 pour des potentiels plus positifs (**Figure 1.10**) et leur localisation privilégiée pourrait aider à maintenir l'excitabilité ainsi que la conduction. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les paramètres biophysiques ainsi que l'amplitude d' $I_{Na}$  pic et  $I_{NaL}$  en condition contrôle et après 45 minutes d'ischémie sur des cardiomyocytes de ventricules gauches de chiens. Nous avons également déterminé le taux de participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{NaL}$ . Nos résultats montrent que l'ischémie a diminué l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ , mais augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$ . De plus, nos résultats préliminaires sur  $I_{NaL}$  semblent indiquer que l'ischémie entraîne un remodelage ionique en faveur des nNaVs.

### **Hypothèse et objectifs de travail :**

L'ischémie diminue l'excitabilité cardiaque en limitant notamment la transmission intercellulaire de l'influx électrique. Les nNaVs sont principalement exprimés au niveau des disques intercalaires, mais leur rôle dans la fonction cardiaque est encore méconnu. Notre hypothèse de travail est donc la suivante : l'ischémie entraîne une augmentation de l'expression et de la participation des nNaVs à  $I_{Na}$  pic et  $I_{NaL}$  afin de maintenir l'excitabilité au sein des régions infarctées. Cette adaptation peut néanmoins s'avérer être néfaste puisqu'elle contribue également à l'entrée d'ions sodium dans la cellule. Afin de tester cette hypothèse, nous proposons de répondre aux trois objectifs suivants :

#### **1) Déterminer les effets de l'ischémie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques**

L'ischémie est connue pour diminuer l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ . Afin de vérifier l'efficacité de notre protocole d'ischémie, nous avons comparé les amplitudes sodiques maximales contrôle et ischémique, ainsi que les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux sodiques. L'amplitude d' $I_{Na, Max}$  devrait donc être plus faible en condition ischémique.

## **2) Déterminer le taux de participation des nNavs à $I_{Na, Max}$**

Afin de discriminer les deux types de courants sodiques (Nav1.5 et nNavs), nous avons utilisé le MTSEA qui est un bloqueur sélectif de Nav1.5. Cela nous a donc permis de déterminer le pourcentage de participation des nNavs et de Nav1.5 à  $I_{Na, Max}$  en conditions contrôle et ischémique ainsi que l'effet de l'ischémie sur les paramètres d'activation et d'inactivation des nNavs.

## **3) Déterminer le taux de participation des nNavs à $I_{NaL}$**

L'utilisation du MTSEA limitant la durée du scellement, nous avons donc utilisé les différences d'affinités des différents types de canaux à la TTX afin de les séparer. Nous avons dans un premier temps évalué l'amplitude totale d' $I_{NaL}$  en conditions contrôle et ischémique en perfusant 25  $\mu$ M de TTX. Par la suite, nous avons utilisé différentes concentrations de TTX (de l'ordre du nM et du  $\mu$ M) afin de déterminer le taux de participation des canaux sodiques TTX sensibles et TTX résistants à  $I_{NaL}$  en conditions contrôle et ischémique.

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

### 2.1 Modèles animaux

2.1.1 Étude de l'impact d'une augmentation d'acides gras libres circulants sur le courant sodique cardiaque chez le chien

#### 2.1.1.1 Préparation des animaux

Toutes les procédures animales sont conformes à l'Institut Canadien de la Recherche, au guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (No 036-05), aux principes de soins des animaux de laboratoire (numéro NIH : 85-23, révisée en 1985) et ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel des animaux de l'Université de Sherbrooke. Pour cette étude, nous avons utilisé des femelles bâtarde (sans race pure) pesant entre 25 et 35 kg et âgées d'un an minimum. Les chiennes n'étaient ni gestantes ni allaitantes. Afin de s'assurer de leur bon état de santé général, les animaux ont subi plusieurs tests : examen physique, auscultation cardio-pulmonaire, analyse sanguine et établissement d'un profil biochimique. Seuls les animaux ayant passé avec succès ces tests ont été retenus pour cette étude. Les animaux ont été logés dans des cages individuelles (4x3 mètres) dans des conditions de température (21°C) et de photopériode (cycles de 12/12 heures jour/nuit) contrôlées. Avant toute expérience et afin de stabiliser le poids des animaux, les chiennes ont été nourries avec du Pro-plan au poulet (Purina dog chow) à la même heure une fois par jour pendant une période de deux à trois semaines. Purina Pro-Plan (Nestlé, Mississauga, ON.) est un régime standard comparable à d'autres précédemment utilisés (Kim *et al.*, 2007). Le Pro-plan a été servi selon les recommandations du Conseil National de la Recherche pour l'hébergement de chiens. Les chiens avaient un accès libre à l'eau.

### 2.1.1.2 Procédures chirurgicales

Les procédures préopératoires, les anesthésies ainsi que les chirurgies ont été menées dans des conditions aseptisées afin de prévenir toutes infections. Les animaux étaient mis à jeun 16 heures avant le début de la chirurgie. Le jour de la chirurgie, les animaux ont été pré-conditionnés par des injections sous-cutanées d'acépromazine maléate (0,1 mg/kg) afin de réduire l'appréhension et de sulfate d'atropine (0,02 mg/kg) qui est un agent anticholinergique utilisé pour prévenir les sécrétions de la gorge. L'anesthésie générale a été induite par voie intraveineuse (IV) à l'aide de thiopental de sodium (15 mg/kg) et maintenue tout le long de la chirurgie avec un mélange de 1 à 2,5% d'isoflurane et d'oxygène pur. La saturation en oxygène sanguine, la fréquence cardiaque et l'ECG ont été surveillés pendant l'anesthésie. L'hydratation des animaux a été maintenue à l'aide d'une solution de lactate de Ringer (30 gouttes/min). Une fois les animaux anesthésiés, ils ont été placés sur une table chauffante (37°C) et la partie antérieure du cou a été ouverte par une incision médiane (7 cm) afin de disséquer les tissus conjonctifs, adipeux et musculaires. Deux cathéters PRN (Silastic) pré-montés ont été préparés. Ces cathéters permettent d'adapter l'orifice d'injection (adaptateur BD Luer-Lok à courte compensation, CA) et servent de lignes d'accès pour les cathéters vasculaires insérés sous la peau. Un cathéter Silastic stérile (0,03 mm de diamètre interne (DI) X 0.065 mm de diamètre externe (DE), Down Corning, Midland, MIID) a été inséré dans la veine jugulaire jusqu'à l'oreillette droite pour les perfusions périphériques continues (Uchino *et al.*, 2005). De plus, un autre cathéter Silastic stérile (0,04 mm DI X 0.085 mm DE) a été inséré dans l'artère carotide gauche jusque dans l'arc aortique pour les prélèvements artériels. Une fois la chirurgie terminée, les chiens ont été équipés d'un collier Élisabéthain et d'une veste adaptée (Lomir, Canada) pour protéger les cathéters et les PRN d'éventuels dommages. Les cathéters étaient nettoyés et purgés deux fois par jour avec un mélange de solution saline et d'héparine jusqu'au jour des expériences et des prélèvements sanguins. La buprénorphine (0,02 mg/kg, SC) et des antibiotiques (Longisil penicillin 10,000 U/lbs, IM) ont été donnés immédiatement après la chirurgie afin de prévenir toutes douleurs et septicémie. De la Flamazine a été

appliquée quotidiennement au niveau des régions d'implantation des cathéters afin d'éviter les infections locales.

La période moyenne de récupération pour les animaux était de 7 jours. Les animaux étaient considérés comme remis de l'opération lorsqu'ils présentaient un retour à la normale des paramètres rénaux, hématologiques et métaboliques. Sept à 10 jours après la chirurgie, les animaux témoins et traités ont reçu respectivement une solution saline ou un mélange d'Intralipide (composée de 20% de triglycérides ; 0,02 ml/kg/min) héparine (0,5 unité/kg/min) pendant huit heures (de -510 min à -30 min). L'héparine a été donnée afin de stimuler l'activité de la lipoprotéine lipase afin d'hydrolyser les triglycérides infusés. Au temps 0, les chiens ont été nourris avec un repas iso-calorique. Au cours des trois périodes expérimentales (perfusion de solution saline ou Intralipide : -510 min à -30 min; période basale : -30 min à 0 min et la période post-prandiale : 0 min à 540 min), le sang a été recueilli et les échantillons de plasma ont été préparés pour les analyses biochimiques et métaboliques. Le volume total de sang prélevé ne dépassait pas les 20% du volume total de sang de l'animal.

Les concentrations de cortisol et d'ACTH plasmatiques ont été déterminées en utilisant un anticorps humain (MP, Biomédical) selon la méthode de RIA (Radio-Immuno-Assay) avec un kit de RIA commercial (Immunocorp, MP, Biomédical) adapté pour le chien. Les taux d'AGNE plasmatiques ont été quantifiés en utilisant un test colorimétrique disponible dans le commerce (AGNE kit C; Wako Chemicals, Allemagne). Les taux de triglycérides (TG) ont été déterminés en utilisant un dosage colorimétrique (Trig/GB, Boehringer Mannheim//Roche Diagnostics).

Les échantillons destinés à la détermination des niveaux de glucose et d'insuline ont été recueillis dans des tubes contenant du Na<sub>2</sub> EDTA et du trazylol (7700 KIU/ml, Calbiochem) afin d'inhiber la protéolyse. La concentration plasmatique de glucose a été déterminée par la méthode de la glucose-oxydase (540 nm) et celle de l'insuline en utilisant un kit de dosage d'insuline spécifique au chien (Kit d'immuno-essai enzymatique, Cedarlane, Burlington, CA).

### 2.1.2 Effet d'une exposition *in-utero* à la nicotine sur le courant sodique cardiaque chez le lapin

Pour cette étude, nous avons utilisé des lapins adultes de race New Zealand âgés entre 6 et 8 mois (Charles River, QC, Canada). Nous avons choisi le lapin comme modèle animal pour les raisons suivantes : la courte période de gestation d'une lapine (comprise entre 29 et 35 jours), le nombre élevé de lapereaux par mise bas (entre cinq et neuf) ainsi que la possibilité de répéter fréquemment les accouplements. Entre 10 et 14 jours après l'accouplement (deuxième semaine de gestation), une animalière vérifiait en palpant l'abdomen de l'animal si la fécondation était réussie. C'est alors que deux pompes osmotiques (2ML4, Alzet® Osmotic Pumps, CA, É-U) ont été placées de façon sous-cutanée entre les omoplates. Les pompes osmotiques contenaient chacune 2 ml de solution de nicotine (0.250 g/ml; Nicotine-Hydrogen Tartrate Salt, Sigma-Aldrich, ON, Canada). La vitesse de diffusion des pompes était de 2.5 µl par heure sur une durée de 28 jours. Ce dispositif nous a permis d'exposer de façon *in-utero* les fœtus de lapins à la nicotine. Ces paramètres nous ont permis d'atteindre une concentration sanguine de nicotine située entre 100 et 150 ng/ml. L'implantation des pompes a été effectuée sous anesthésie induite par un mélange d'isoflurane 5% (Abbott, QC, Canada) et d'oxygène pur. Durant la chirurgie, le taux d'isoflurane était diminué à 3%. Les chirurgies étaient effectuées dans des conditions aseptisées et la zone d'incision nettoyée au préalable avec de l'éthanol 100% et une solution de providone iodée 10% (Rougier, QC, Canada). Une fois l'implantation terminée, l'incision était refermée avec des points de suture indépendants. Toutes les manipulations animales effectuées dans cette étude étaient en accord avec les normes du CCPA (Conseil Canadien de Protection des Animaux) et approuvées par le comité d'éthique institutionnel des animaux de l'Université de Sherbrooke.

### 2.1.3 Effet de l'épilepsie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque

Des rats mâles et femelles adultes Wistar (Dr Carmant, Centre de recherche au CHU Ste Justine, Montréal) ont été hébergés individuellement avec un libre accès à la nourriture et à l'eau et exposés à un cycle circadien de 14 heures de lumière et 10 heures d'obscurité. Les crises d'épilepsie ont été induites par une injection intrapéritonéale (i.p.) de chlorure de lithium (LiCl, 130 mg/kg). Le jour suivant, les animaux ont été injectés de manière sous-cutanée (SC) avec du méthyl-bromure d'atropine (10 mg/kg) pour soulager les effets de la pilocarpine. Après 30 minutes, des injections séquentielles SC d'hydrochlorure de pilocarpine (10 mg/kg) ont été administrées aux 30 minutes (trois-quatre injections). Le SE a été confirmé par l'apparition de crises au niveau du cerveau limbique qui débute 10-15 minutes après l'injection de la pilocarpine. Seuls les animaux montrant un comportement de crise épileptique, qui se manifeste lorsque l'animal se cabre ou se cabre et tombe, ce qui correspond aux stades quatre et cinq selon l'échelle de Racine (Racine, 1972), ont été utilisés pour cette étude. Les rats ont ensuite été injectés en i.p. avec du diazépam (5 mg/kg) et de la phénytoïne (50 mg/kg) trois et huit heures après le déclenchement des premières crises afin de soulager les animaux et d'augmenter le taux de survie. Les animaux contrôles ont reçus du LiCl, de l'atropine, du diazépam, de la phénytoïne et de la saline en remplacement de la pilocarpine. Presque tous les rats qui font l'expérience du SE pendant au moins 60 minutes développent de l'épilepsie chronique. La période de latence moyenne de la première crise spontanée d'épilepsie survient approximativement à 37 jours post-injection. Les animaux qui montrent des crises spontanées ont été sacrifiés 45 jours après le SE initial et ont été comparés aux animaux contrôles. Le taux de mortalité (environ 20%) survient majoritairement durant les crises. Enfin, les animaux peuvent montrer des comportements d'automutilation et souffrir de déshydratation, de perte de poids, d'écoulements nasaux et plus rarement de problèmes respiratoires (sifflements).

#### 2.1.4 Effet de l'ischémie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque

Toutes les procédures animales sont conformes à l'Institut Canadien de la Recherche, au guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (No 036-05). Pour cette étude, nous avons utilisé des femelles bâtarde pesant entre 25 et 35 kg et âgées d'un an minimum. Les chiennes n'étaient ni gestantes, ni allaitantes. Comme mentionné dans le projet décrit dans la section 2.1.1.1, seuls les animaux en bonne santé ont été retenus (réussite aux examens physiques, auscultation cardio-pulmonaire, analyse sanguine et établissement d'un profil biochimique). L'ischémie a été réalisée sur des cardiomyocytes de ventricule gauche isolés à l'aide de la solution de Krebs-Heinseleit (KH) contenant en mmol/l : 121 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 NaHCO<sub>3</sub> et 5 glucose (pH équilibré à 7.4 : oxygénation pendant 30 minutes avec 95% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>). Les cardiomyocytes ont été placés dans des tubes Eppendorf 1 ml et centrifugés à 100G maximum pendant 1 min afin de remplacer la solution de conservation (Krebs-bicarbonate :KB) des cellules par du KH. Une deuxième centrifugation a été effectuée afin de ne laisser qu'un minimum de solution KH. Par la suite, les culots baignant dans un minimum de solution KH ont été recouverts d'une fine couche d'huile minérale pendant 45 minutes à température pièce afin de mimer l'ischémie (condition d'hypoxie). La reperfusion consistait à placer les cellules soit dans la solution extracellulaire faible en sodium pour les enregistrements d' $I_{Na, Max}$  ou sodium normal pour les enregistrements d' $I_{NaL}$  (résultats préliminaires) ou alors dans du KB et conservées à 4°C. Toutes les fractions de cellules ischémiques ont été utilisées dans les deux heures post ischémie.

## 2.2 Prélèvement du cœur et dissociation cellulaire cardiaque

Immédiatement après la dernière prise de sang (pour le projet des animaux IH), et de façon standard valable pour tous les autres projets, les animaux ont été sédatisés avec un mélange d'Atravet (0,25 mg / kg IM) et d'héparine (5000 U)

pendant 30 minutes afin d'éviter la coagulation du sang, puis anesthésiés avec du sodium pentobarbital (25 mg / kg IV, Bimeda-MTC, ON, Canada). Pour les chiens, le cœur encore battant fut rapidement prélevé par une incision au niveau du cinquième espace intercostal, causant ainsi l'euthanasie de l'animal. Pour les cœurs des rats et lapins, le cœur a été retiré suite à l'ouverture de la cage thoracique conduisant également à l'euthanasie des animaux. Pour le projet IH, des autopsies ont été effectuées de façon systématique pour vérifier la position des cathéters vasculaires et collecter les organes et tissus. Les myocytes ont été obtenus par dissociation enzymatique comme décrite précédemment (Cordeiro et al., 2004). Les conditions de dissociation des cardiomyocytes pour les différents animaux étaient identiques. Cependant, une partie de ventricule gauche était découpée pour les chiens puis perfusée par une artère coronarienne, tandis que pour les rats et lapins, le cœur en entier fut perfusé par l'aorte (perfusion rétrograde) et installé sur le système Langendorff. Les cœurs ou morceaux de ventricules gauches ont ensuite été perfusés à 35°C pendant 10 mn avec une solution de Tyrode dépourvue de calcium et contenant 2 mM d'EGTA et 0,1% de BSA. La solution de perfusion a été par la suite remplacée par une solution de Tyrode contenant 0.1 mM de calcium et 230 U/ml de collagénase de type II (CLS 2, Worthington, Freehold, New Jersey). Cette solution a été ensuite remise en circulation pendant 10 à 20 minutes jusqu'à ce que le tissu soit décoloré (brun) et pâteux. Le morceau de tissu est finalement retiré et haché dans plusieurs béchers contenant de la solution enzymatique et placé sous agitation lente. Le surnageant, contenant les cellules dissociées, a été placé dans des tubes de 10 ml et stocké à +4°C dans une solution de Krebs contenant en mmol/l : 100 glutamate de potassium, 10 aspartate de potassium, 25 KCl, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 20 Taurine, 5 créatine, 0,5 EGTA, 20 glucose, HEPES 10, 2% de BSA et 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. Respectivement pour les projets de lapins et rats, seuls les cardiomyocytes de l'oreillette droite et des deux ventricules étaient dissociés.

## 2.3 Électrophysiologie

Les cardiomyocytes isolés ont été placés dans une chambre montée sur un microscope inversé (Nikon Diaphot, Tokyo, Japon) et perfusés avec une solution extracellulaire dont la composition variait selon le projet. Concernant les projets utilisant des chiens et lapins, la solution suivante a été utilisée (en mmol/l) : 120 Choline-Cl, 10 NaCl, 5 NaOH, 2.8 Na Acétate, 4 KOH, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 10 Glucose (pH ajusté à 7.4 avec du NaOH). Le sodium a été remplacé de façon équimolaire par de la Choline-Cl afin de compenser l'osmolarité et de diminuer l'amplitude du courant  $I_{Na, Max}$  afin d'avoir un bon contrôle sur le voltage et d'éviter toute saturation lors des enregistrements. En revanche, pour les rats, la solution suivante fut utilisée afin de diminuer davantage l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  et de permettre des enregistrements de qualité en présence d'isoprotérénol et de chélérythrine (mmol/l) : 125 Choline-Cl, 2.5 NaCl, 2.5 NaOH, 2.8 Na Acétate, 4 KOH, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 10 Glucose (pH ajusté à 7.4 avec du NaOH). Finalement, les enregistrements d' $I_{NaL}$  (rats et résultats préliminaires d'ischémie) ont été effectués en perfusant une solution 'sodium normal' contenant en mmol/l : 125 NaCl, 5 NaOH, 2.8 Na Acétate, 4 KOH, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 10 Glucose (pH ajusté à 7.4 avec du NaOH). Nous avons augmenté la concentration en sodium extracellulaire afin de faciliter l'enregistrement d' $I_{NaL}$  qui est un courant de très faible amplitude. Le cocktail de bloqueurs utilisé fut en revanche toujours le même. Le Tetra-éthyl ammonium (TEA, 5 mmol/l), CoCl<sub>2</sub> (1 mmol/l) et BaCl<sub>2</sub> (5 mmol/l) ont été utilisés afin de bloquer les courants  $I_{to}$ ,  $I_{CaL}$  et  $I_{K1}$  respectivement. Les courants membranaires ont été enregistrés en configuration cellule entière en utilisant la technique de patch clamp (Dumaine et Cordeiro, 2007; Haufe et al., 2005a). Tous les enregistrements ont été effectués à température pièce (22°C) à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200B (Axon instruments, Union City CA) équipé d'une tête CV-201A (Axon Instruments, Foster City, CA). La résistance des pipettes était comprise entre 1 et 3 MΩ une fois remplie avec une solution contenant en mmol/l : 15 NaCl, 5 KCl, 120 CsF, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 4 Na<sub>2</sub>-ATP, 10 EGTA et 10 HEPES (pH ajusté à 7.2 avec du CsOH). Toutes les solutions ont été ajustées à 300 mOsm avec du sucre. Les courants

ont été filtrés à 5 kHz et numérisés à 10 kHz. Les enregistrements d' $I_{NaL}$  ont en revanche été filtrés à 1 kHz. L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées à l'aide des logiciels pCLAMP V9.2 (Axon instruments), EXCEL (Microsoft) et ORIGIN 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA). Les compensations de la capacitance et de la résistance série (85%) ont été optimisées afin de minimiser l'artéfact capacitif et d'augmenter le contrôle sur le voltage. Le courant de fenêtre sodique a été calculé selon le modèle de Hodgkin et Huxley (HODGKIN et HUXLEY, 1952) qui se base sur la superposition des courbes d'activation et d'inactivation :  $I_{Na} = G_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (V_m - E_{Na})$  où  $G_{Na}$ ,  $m$ ,  $h$ ,  $V_m$  et  $E_{Na}$  correspondent respectivement à la conductance maximum, aux fractions de courants activées et non-inactivées, au potentiel membranaire et au potentiel d'inversion du sodium. Les bloqueurs suivants : TTX, Isoprotérénol et Chébérythine (bloqueur de PKC) ont été dilués dans la solution extracellulaire appropriée à l'expérience. Le H-89 (bloqueur de PKA) a été dilué dans du DMSO 100% et sa concentration finale ne dépassait pas 0.01% du volume total.

## 2.4 Analyses statistiques

Les données ont été présentées selon la moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons entre les groupes salin et IH ont été faites à l'aide d'un test ANOVA à deux voies. Les comparaisons d'amplitudes maximales ont été faites à l'aide d'un test-T de façon non pairées (corrige par le test Mann-Whitney lorsque le nombre d'échantillons était inférieur à 30). Finalement, les comparaisons des courbes lissées selon la formule de Boltzmann ont été effectuées avec un F-test.

## Chapitre III: Résultats

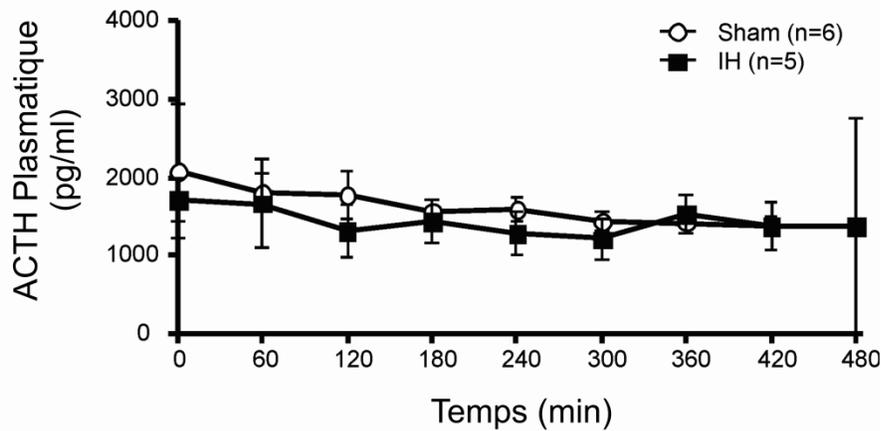
### 3.1 Effets d'une augmentation systémique d'acides gras libres chez le chien sur les propriétés électrophysiologiques du courant sodique cardiaque

Dans un premier temps, nous avons déterminé les niveaux de corticotropes (adrénocorticotrophine, ACTH) et de cortisol pendant et après le traitement IH afin d'éliminer les possibles artéfacts liés au stress durant l'expérimentation. Les dosages présentés ci-dessous ont été réalisés par Lucie Chouinard (cortisol, ACTH) et Lucie Bouffard (TG et NEFA).

3.1.1 La procédure expérimentale n'augmente pas le niveau de stress des animaux

*3.1.1.1 La procédure expérimentale n'augmente pas le taux plasmatique d'ACTH des animaux*

L'ACTH est une hormone sécrétée au niveau de l'hypophyse pouvant stimuler la glande surrénale et donc la sécrétion de cortisol. En état de stress chronique, la sécrétion d'ACTH augmente ce qui va engendrer une augmentation de la sécrétion de cortisol par l'intermédiaire de la glande surrénale. La **figure 3.1.1.1** montre que le taux d'ACTH plasmatique reste constant durant toute l'expérience pour les conditions sham et IH. Les taux moyens d'ACTH durant toute la durée du protocole sont de  $1573.8 \pm 239.3$  pg/ml et  $1414.4 \pm 369.4$  pg/ml respectivement pour les conditions sham et IH. Nos résultats montrent que le niveau d'ACTH n'est pas significativement différent entre les groupes. La régulation du cortisol par l'ACTH, et le niveau de stress est donc similaire.

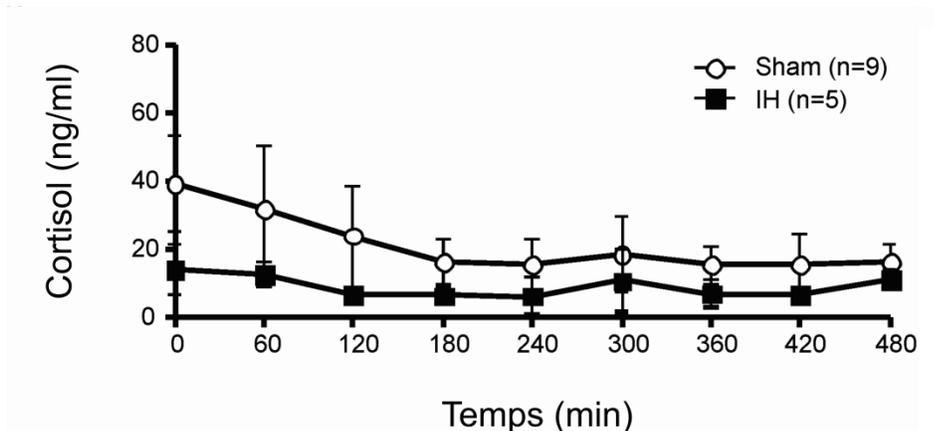


**Figure 3.1.1.1 Concentration plasmatique d'ACTH chez les chiens sham et IH**

Le taux d'ACTH reste stable tout au long de la procédure pour les conditions sham et IH. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.1.1.2 La procédure expérimentale n'augmente pas le taux de cortisol plasmatique des animaux

Le cortisol est une hormone sécrétée par la glande surrénale. Elle joue un rôle de régulateur métabolique pouvant stimuler l'augmentation de la concentration sanguine en glucose. La sécrétion de cortisol est augmentée en état de stress chronique ce qui peut faire varier les concentrations plasmatiques de glucose. La **figure 3.1.1.2** montre que le taux de cortisol plasmatique reste constant durant toute l'expérience pour les conditions sham et IH. Les taux moyens de cortisol durant toute la durée du protocole sont de  $19.7 \pm 11.2$  ng/ml et  $13.4 \pm 7.3$  ng/ml respectivement pour les conditions sham et IH. Nos résultats montrent que le niveau de cortisol n'est pas significativement différent entre les groupes ce qui conforte les résultats obtenus pour l'ACTH (**Figure 3.1.1.1**). Le niveau de stress ainsi que la régulation du glucose plasmatique par le cortisol est donc similaire dans tous les groupes.



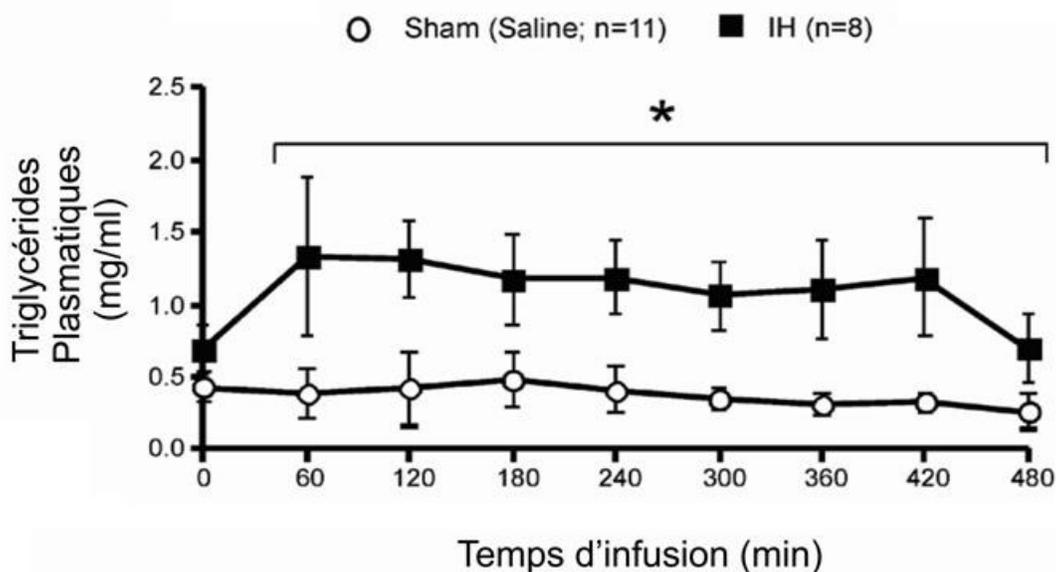
**Figure 3.1.1.2 Concentration plasmatique de cortisol chez les chiens sham et IH**

Le taux de cortisol reste stable tout au long de la procédure pour les conditions sham et IH. Valeurs  $\pm$  SEM.

3.1.2 La co-perfusion de triglycérides (TG) et d'héparine augmente significativement les taux plasmatiques de TG et d'AGNE chez les chiens IH

#### 3.1.2.1 Augmentation du taux de TG chez les chiens IH

La **figure 3.1.2.1** montre que le taux plasmatique de TG est significativement augmenté chez les chiens IH pendant toute la période de perfusion comparativement aux sham. Les TG sont stockés dans les cellules adipeuses et sont une source d'énergie très importante pour l'organisme. Les taux moyens de TG plasmatiques pendant la perfusion sont de  $0.4 \pm 0.1$  mg/ml et  $1.0 \pm 0.26$  mg/ml respectivement pour les conditions sham et IH. Nos résultats montrent qu'après huit heures de perfusion, la concentration plasmatique en TG augmente de façon significative. Par la suite, les triglycérides sont dégradés en AGNE qui sont une forme libre d'acides gras, permettant l'apport d'énergie à des tissus dépourvus ou éloignés de cellules adipeuses.

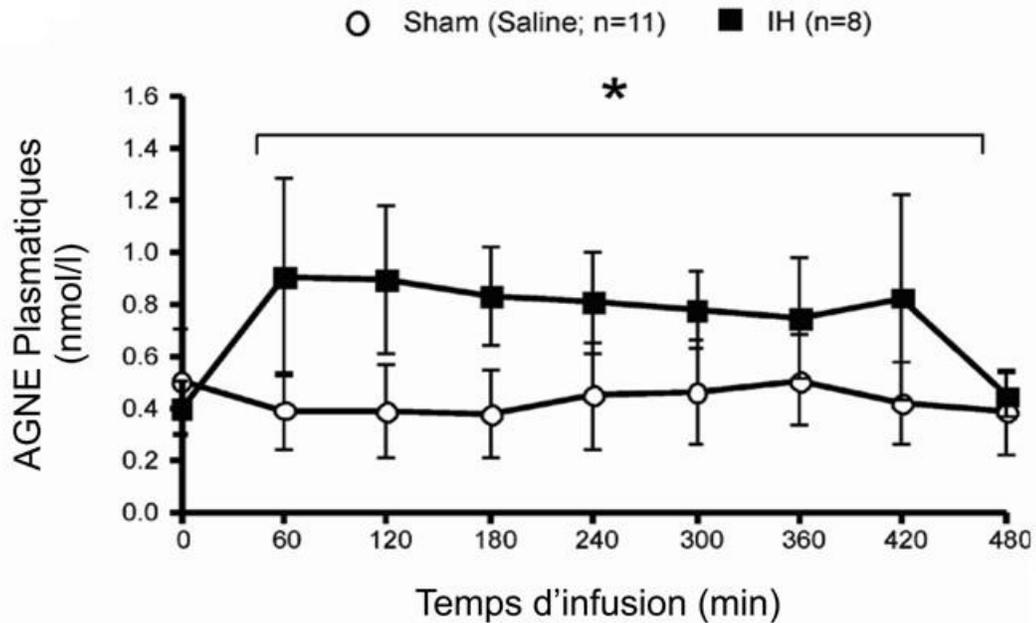


**Figure 3.1.2.1 Concentration plasmatique de triglycérides chez les chiens sham et IH**

Pendant la période de perfusion, le taux de TG plasmatique en condition IH est significativement supérieur à celui des chiens sham. \* $P < 0,05$ , valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.1.2.2 Augmentation du taux d'AGNE chez les chiens IH

La **figure 3.1.2.2** montre que le taux plasmatique d'AGNE est significativement augmenté chez les chiens IH pendant toute la période de perfusion par rapport aux sham. La co-perfusion d'héparine permet l'activation de la lipoprotéine lipase dont le rôle est de dégrader les TG plasmatiques en AGNE. Les taux moyens d'AGNE plasmatiques pendant la perfusion sont de  $0.4 \pm 0.1$  mg/ml et  $0.7 \pm 0.2$  mg/ml respectivement pour les conditions sham et IH. Nos résultats montrent qu'après huit heures de perfusion, la concentration plasmatique en AGNE augmente de façon significative. Le taux plasmatique d'AGNE étant directement lié au taux de TG, ces résultats confortent ceux obtenus précédemment.



**Figure 3.1.2.2 Concentration plasmatique des AGNE chez les chiens sham et IH**

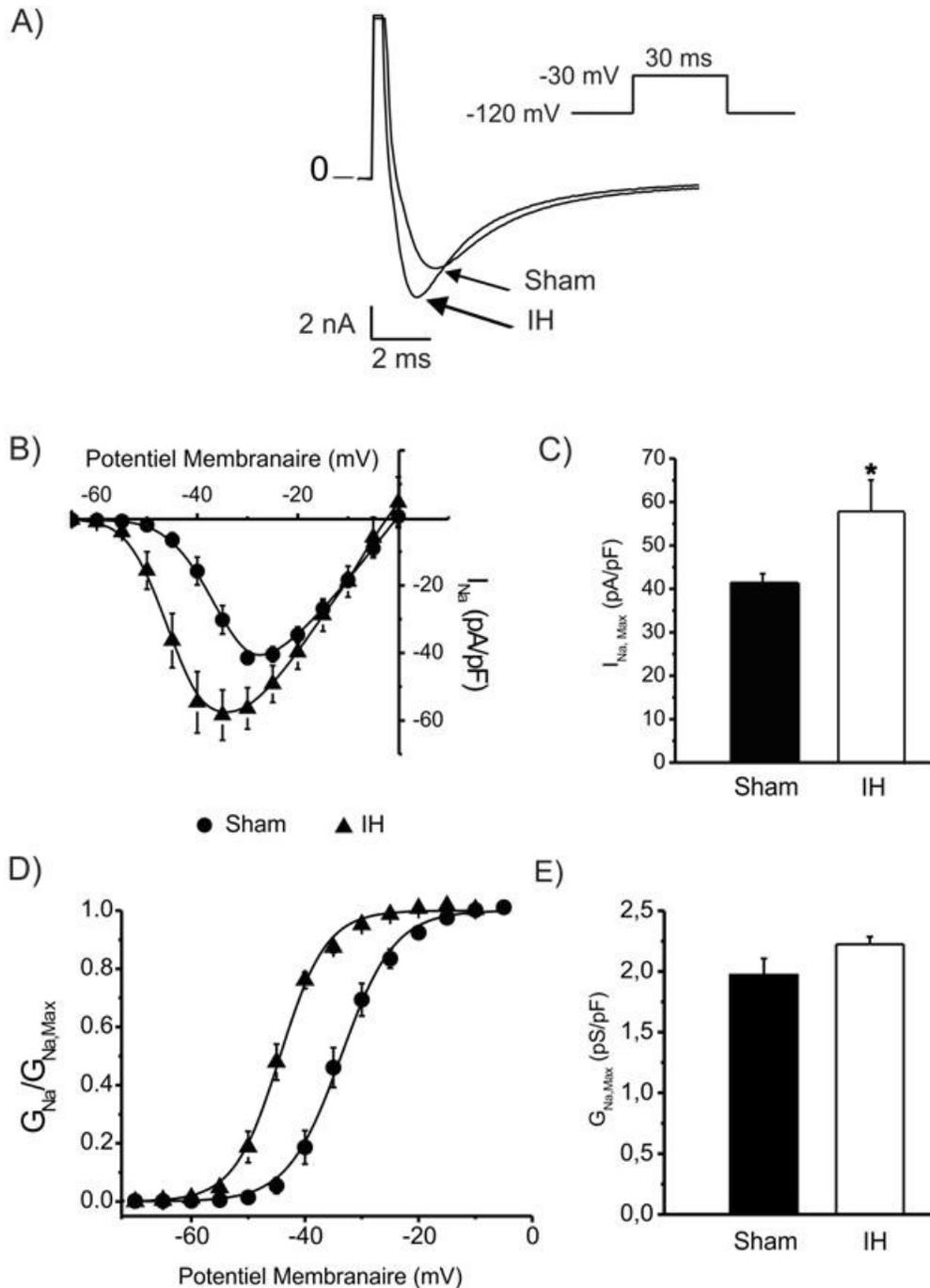
Pendant la période de perfusion (-540 à 60 minutes), le taux d'AGNE plasmatique en condition IH est supérieur à celui des chiens sham. \* $P < 0,05$ , valeurs  $\pm$  SEM.

3.1.3 La perfusion d'acides gras libres augmente la densité de courant, décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés et augmente l'amplitude du courant de fenêtre d' $I_{Na}$

3.1.3.1 La perfusion d'acides gras libres augmente la densité de courant et décale la courbe d'activation d' $I_{Na}$  vers des potentiels plus négatifs

L'exposition chronique à des concentrations sériques élevées de lipides pourrait conduire à l'apparition d'un DT2 et finalement, déclencher un remodelage ionique cardiaque conduisant au développement d'une cardiomyopathie diabétique. La perfusion d'acides gras polyinsaturés *in vitro* est connue pour modifier la cinétique et réduire l'expression du courant sodique cardiaque ( $I_{Na}$ ) dans des modèles d'expression hétérologues (HEK) ou sur des cardiomyocytes isolés (Xiao *et al.*, 1995; Kang et Leaf, 1996; Vreugdenhil *et al.*, 1996; Leifert *et al.*, 1999, 2000; Xiao *et al.*, 2005; Pignier *et al.*, 2007; Boland et Drzewiecki, 2008). Nous avons donc testé si un remodelage électrophysiologique cardiaque précoce

survient lors d'un traitement IH en mesurant l'amplitude du courant sodique cardiaque. La **figure 3.1.3.1A** montre deux tracés de courants représentatifs en conditions sham et IH. La **figure 3.1.3.1B** correspond aux courbes courant-potentiel (I/V) obtenues pour les différentes conditions. Nos résultats montrent que la perfusion d'acides gras libres a décalé à la fois le seuil d'activation de -55 mV à -60 mV et le courant sodique pic de -30 à -35 mV. La perfusion d'acides gras libres augmente significativement l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  de  $-41.4 \pm 1.9$  pA/pF à  $-58.4 \pm 7.4$  pA/pF (**Figure 3.1.3.1B et C**). Afin de déterminer l'origine de cette augmentation de courant et du déplacement du seuil d'activation, nous avons comparé les paramètres d'activation des canaux sodiques en condition sham et IH. Les courbes ont été lissées selon la distribution de Boltzmann:  $G_{Na}/G_{Na,Max} = 1/(1+e^{(V-V_{1/2})/k})$  où V est le voltage membranaire,  $G_{Na}$  la conductance ionique,  $G_{Na,Max}$  la conductance maximale,  $V_{1/2}$  le voltage membranaire pour lequel la moitié des canaux sont ouverts et k décrit la pente de la partie linéaire (dépendance de l'ouverture des canaux par rapport au changement de voltage). La **figure 3.1.3.1D** montre que la perfusion d'acides gras libres a significativement décalé le potentiel de demi-activation de  $-33.7 \pm 0.2$  mV à  $-44.4 \pm 0.2$  mV respectivement pour les conditions sham et IH ( $p < 0.05$ , F-test). La conductance maximale des canaux sodique est déterminée par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe I/V. La **figure 3.1.3.1E** montre que la conductance maximale des canaux sodiques n'est pas modifiée en condition IH. Les valeurs sont de  $2.0 \pm 0.2$  pS/pF et de  $2.2 \pm 0.1$  pS/pF respectivement en conditions sham et IH. Cela nous indique que la perfusion de lipides a essentiellement affecté les propriétés biophysiques des canaux sodiques plutôt que d'induire une augmentation d'expression. L'augmentation de courant observée sur la courbe I/V est donc, en partie, due au décalage d'environ -10 mV du  $V_{1/2}$  observé sur la courbe d'activation, puisque pour un même potentiel appliqué, plus de canaux sont activés en condition IH.



**Figure 3.1.3.1 L'augmentation d'acides gras libres circulants chez le chien augmente la densité et décale la courbe d'activation d'INa vers des potentiels plus négatifs**

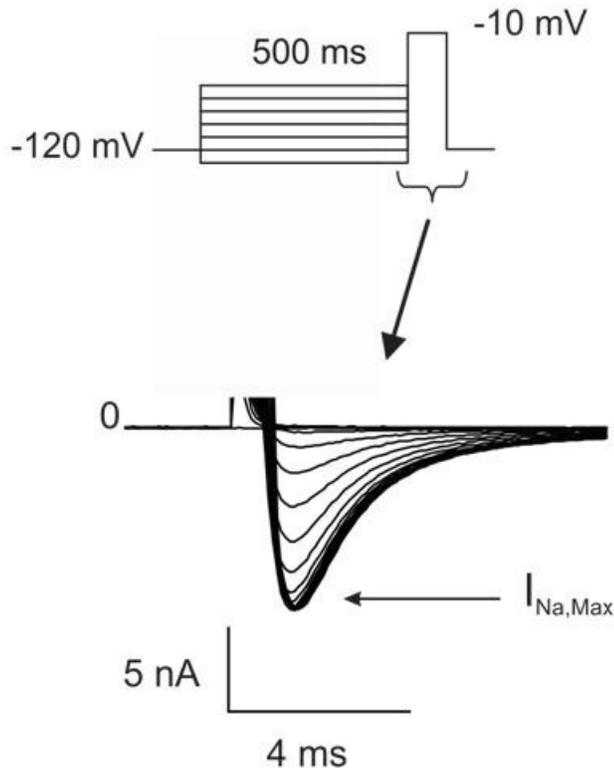
**A)** Tracés de courants sham et Intralipidique-Héparine (IH) obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole est composé dans son ensemble d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants de pic ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du

potentiel appliqué pour les conditions sham et IH. **C)** Histogramme des amplitudes maximums d' $I_{Na}$ . **D)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. La perfusion d'acides gras libres décale significativement le potentiel de demi-activation vers des potentiels plus hyperpolarisés ( $p < 0.05$ , F-test). **E)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). La perfusion d'acides gras libres ne modifie pas les conductances. (Sham :  $n=11$  ; IH :  $n=11$ ). \* $P < 0,05$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.1.3.2 La perfusion systémique d'acides gras libres diminue la disponibilité des canaux sodiques

Afin de déterminer si un changement dans la disponibilité des canaux sodiques participe au décalage d' $I_{Na, Max}$ , nous avons déterminé la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en conditions sham et IH. La **figure 3.1.3.2A** montre un tracé de courant représentatif obtenu grâce au protocole de stimulation illustré dans l'encart. Les courbes d'inactivation sham et IH ont été obtenues selon le rapport :  $I_{Na}/I_{Na, Max}$  (**figure 3.1.3.2B**). Les courbes ont été lissées selon la distribution de Boltzmann:  $I_{Na}/I_{Na, Max} = (1/1 + e^{(V - V_{1/2})/k})$  où  $V$  est le voltage membranaire,  $I_{Na}$  la conductance ionique,  $I_{Na, Max}$  la conductance maximale,  $V_{1/2}$  le voltage membranaire pour lequel la moitié des canaux sont ouverts et  $k$  décrit la pente de la partie linéaire (dépendance de l'ouverture des canaux par rapport au changement de voltage). La **figure 3.1.3.2B** montre que la perfusion d'acides gras libres a faiblement, mais significativement, décalé les valeurs des potentiels de demi-inactivation de  $-66.7 \pm 0.4$  mV à  $-70.8 \pm 0.2$  mV respectivement pour les conditions sham et IH ( $p < 0.05$ , F-test). Cela nous indique que la disponibilité des canaux sera davantage diminuée pour des potentiels dépolarisés chez les animaux IH. Cet effet n'est pas compatible avec l'augmentation d' $I_{Na}$  observée sur la relation courant-potentiel (**Figure 3.1.3.1B**) ce qui indique que l'augmentation d' $I_{Na, Max}$  est principalement due à un changement dans les propriétés d'activation des canaux sodiques.

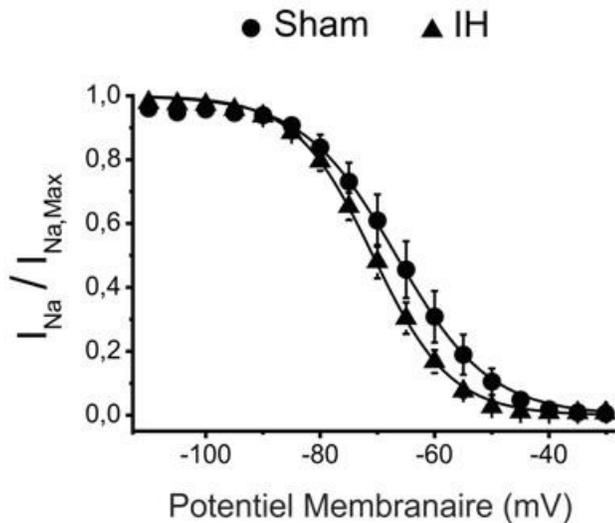
A)



**Figure 3.1.3.2 La perfusion d'acides gras libres diminue la disponibilité des canaux sodiques**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'une impulsion test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante à l'impulsion test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation sham et IH ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=8 ; IH : n=14). Valeurs  $\pm$  SEM.

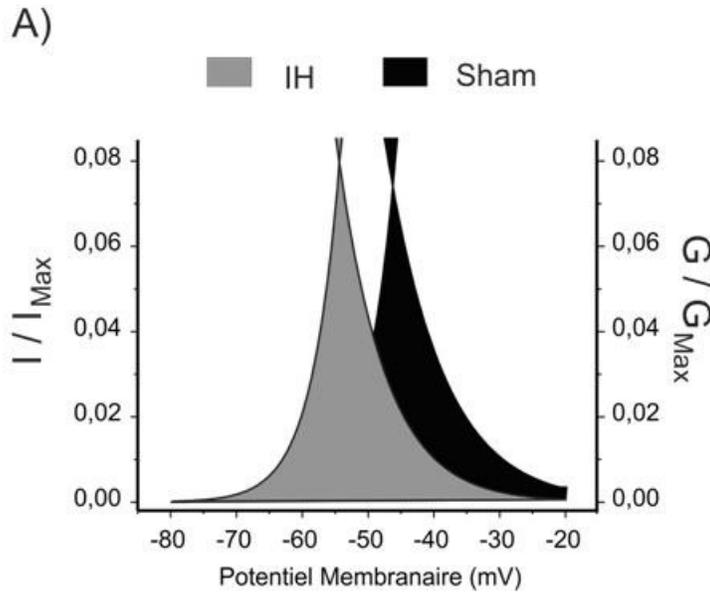
B)



### 3.1.3.3 La perfusion systémique d'acides gras libres augmente l'amplitude du courant de fenêtre

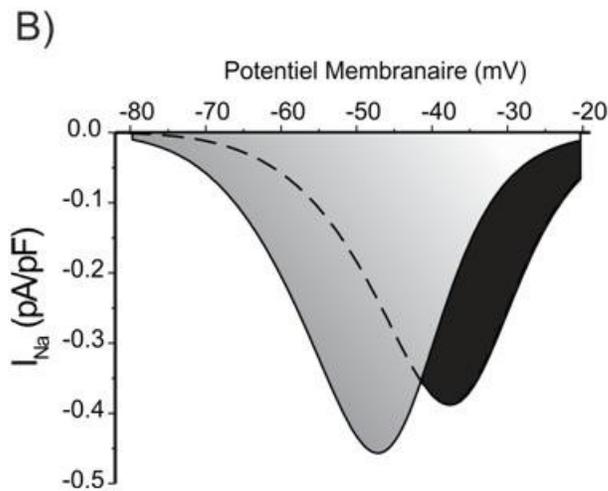
Les résultats obtenus montrent que la perfusion d'acides gras libres décale significativement les courbes d'activation ( $m_\infty$ ) et d'inactivation ( $h_\infty$ ) vers des potentiels plus hyperpolarisés. La superposition des courbes d'activation et d'inactivation délimite une région appelée 'courant de fenêtre' ( $I_w$ ). Dans cette région, la population de canaux s'équilibre entre différents états (ouverts, fermés et inactivés) ce qui entraîne la présence d'un courant dépolarisant dit de fuite. La **figure 3.1.3.3A** représente la superposition des courbes  $m_\infty^3$  et  $h_\infty$  en condition sham et IH et montre que la région correspondante au courant de fenêtre est décalée vers des potentiels plus hyperpolarisés. La valeur du courant de fenêtre est obtenue par la multiplication de la conductance du courant ( $G_{Max}$ ) pour toutes les forces électromotrices utilisées ( $V_M - E_{Na}$ ) par les valeurs de  $V_{1/2}$  (activation et inactivation) selon le modèle d'Hodgkin et Huxley :  $G_{Max} * h_\infty * m_\infty^3 * (V_M - E_{inv})$ . La **figure 3.1.3.3B** montre que l'amplitude du courant de fenêtre sodique est augmentée en condition IH. L'augmentation de l'amplitude du courant de fenêtre peut avoir plusieurs conséquences sur l'activité électrique cardiaque. Selon nos résultats, le courant de fenêtre est augmenté pour des potentiels compris entre -80 mV et -40 mV et est décalé vers des potentiels plus négatifs. L'amplitude d' $I_w$  est donc plus grande en condition IH pour des potentiels proches du potentiel membranaire de repos. Cela peut donc augmenter l'excitabilité en augmentant la quantité de courant activé durant la diastole. Mais il peut également être responsable d'une surcharge calcique intracellulaire par l'intermédiaire de l'échangeur sodium/calcium (Na/Ca). L'échangeur Na/Ca permet de faire sortir trois ions sodium et entrer un ion calcium dans la cellule. Son mode de fonctionnement dépend du potentiel membranaire et peut être par conséquent inversé. Une augmentation du courant de fenêtre sodique entraîne donc une augmentation de la concentration intracellulaire en ions sodium qui sont ensuite expulsés en dehors de la cellule par l'échangeur Na/Ca. En contrepartie, la concentration intracellulaire en ions calcium augmente.  $I_w$  module donc le gradient

de calcium et sodium intra et extracellulaire, mais contribue également au potentiel membranaire de repos.



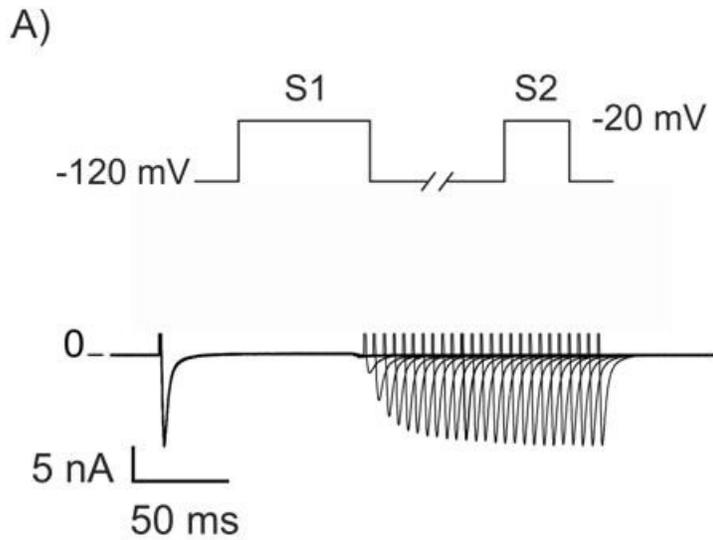
**Figure 3.1.3.3 La perfusion d'acides gras libres circulants augmente le courant de fenêtre sodique**

**A)** Superposition des courbes d'activation et d'inactivation pour les conditions Sham et IH. Les courbes ont été lissées selon la formule de Boltzmann. **B)** Courant de fenêtre voltage dépendant pour le courant sodique en condition sham et IH exprimé en densité. (Sham : n=8 ; IH : n=11).



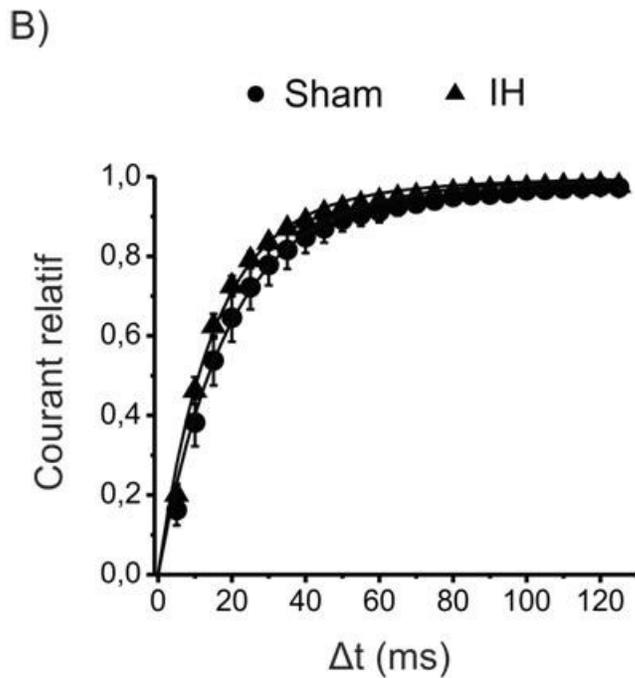
#### *3.1.3.4 La perfusion systémique d'acides gras libres augmente faiblement le temps de réactivation des canaux sodiques*

La période réfractaire cardiaque est fortement tributaire de la récupération des canaux sodiques à partir de leur état inactivé et est impliquée dans de nombreux types d'arythmies telles que les phénomènes de réentrées. Afin de déterminer si le traitement IH modifie le temps de réactivation des canaux sodiques, nous avons utilisé un protocole composé d'un double pulse test (S1-S2) à -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms. Après la première stimulation S1, les canaux se retrouvent inactivés. Lorsque l'intervalle  $\Delta t$  est court, une faible quantité de canaux est réactivée. Plus  $\Delta t$  augmente et plus la quantité de canaux disponibles augmente. La **figure 3.1.3.4A** montre un tracé de courant représentatif obtenu grâce au protocole de stimulation illustré dans l'encart. La **figure 3.1.3.4B** montre que la perfusion d'acides gras libres augmente le temps de réactivation des canaux sodiques (T-test). Les courbes ont été obtenues suite à un lissage double exponentiel. Les valeurs des constantes de temps rapide ( $\tau_r$ ) sont de  $18.0 \pm 0.5$  ms et  $14.36 \pm 0.4$  ms pour les conditions sham et IH. Les valeurs des constantes de temps lent ( $\tau_l$ ) sont de  $51.1 \pm 9.7$  et  $47.9 \pm 8.5$  respectivement pour les conditions sham et IH. La perfusion d'acides gras libres augmente uniquement la composante rapide ( $\tau_r$ ) du temps de réactivation des canaux sodiques.



**Figure 3.1.3.4 L'augmentation d'acides gras libres circulants chez le chien augmente le temps de réactivation des canaux sodiques**

**A)** Protocole standard double pulse (S1-S2) de -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms. **B)** Courbes de réactivation pour les conditions sham et IH. Les courbes ont été obtenues par le rapport de :  $I_{Na}$  (S2/S1) en fonction de  $\Delta t$  et lissées par une fonction double exponentielle. (Sham : n=6 ; IH : n=10). Valeurs  $\pm$  SEM.



	Sham	IH
$I_{Na}$ , pA/pF	$-41.4 \pm 1.9$	$58.4 \pm 7.4^*$
$G_{Na, Max}$ , pS/pF	$2.0 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$
<b>Activation</b>		
$V_{1/2}$ , mV	$-33.7 \pm 0.2$	$-44.4 \pm 0.2^*$
k, mV	$4,7 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,1$
<b>Inactivation</b>		
$V_{1/2}$ , mV	$-66.7 \pm 0.4$	$-70.8 \pm 0.2^*$
k, mV	$8.1 \pm 0.3$	$6.8 \pm 0.2$
<b>Réactivation</b>		
$A_r$	$0.9 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.1$
$\tau_r$ , ms	$18.0 \pm 0.5$	$14.36 \pm 0.4^*$
$A_l$	$0.1 \pm 0.1$	$0.1 \pm 0.2$
$\tau_l$ , ms	$47.9 \pm 8.5$	$51.1 \pm 9.7$

**Tableau 1 Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions contrôle et IH**

$I_{Na}$  correspond au courant sodique ;  $G_{Na, Max}$  à la conductance maximum ;  $V_{1/2}$  au potentiel de demi-(in)activation ; k au facteur de pente de l'(in)activation ;  $\tau_r$  et  $\tau_l$  aux constantes de temps rapide et lente de la réactivation;  $A_r$  et  $A_l$  correspondent respectivement aux amplitudes rapide et lente associées aux constantes de temps. \* $P < 0.05$ , T-test et F-Test. Valeurs  $\pm$  SEM.

*En résumé, nous avons développé un modèle canin mimant les premières étapes du développement d'un diabète de type 2 (DT2). Notre modèle nous a permis d'étudier les changements précoces intervenant avant l'établissement d'un DT2. L'absence de stress chez nos animaux est un facteur primordial pour l'étude du métabolisme des acides gras. Nos résultats montrent que la procédure n'engendre aucune modification des taux d'ACTH et de cortisol et qu'une co-perfusion d'intralipides-héparine pendant 8 heures augmente significativement les*

*taux plasmatiques de TG et d'AGNE. Cette augmentation aiguë des taux circulants d'acides gras libres est néanmoins suffisante pour observer des modifications à long terme sur les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques. Nos résultats montrent que le seuil d'activation ainsi que le pic de courant sodique ont été décalés de 5 mV vers des potentiels plus négatifs. La perfusion d'acides gras libre augmente donc l'excitabilité puisque le seuil d'activation des canaux sodiques est plus proche du potentiel membranaire de repos en condition IH. Nos résultats montrent également une diminution significative de la disponibilité en condition IH. Le décalage des courbes d'activation et d'inactivation entraîne une augmentation de l'amplitude du courant de fenêtre pour des potentiels intervenant durant la phase de diastole (entre -80 et -40 mV) et un décalage du pic de -35 à -50 mV. Finalement, le temps de réactivation des canaux sodiques n'est pas altéré suite au traitement IH.*

*Les résultats de cette étude ont d'ailleurs été publiés depuis : Biet M, Morin N, Benrezzak O, Naimi F, Bellanger S, Baillargeon JP, Chouinard, L, Gallo-Payet N, Carpentier AC, Dumaine R. Lasting alterations of the cardiac sodium current by short term hyperlipidemia as a mechanism for initiation of cardiac remodeling. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.*

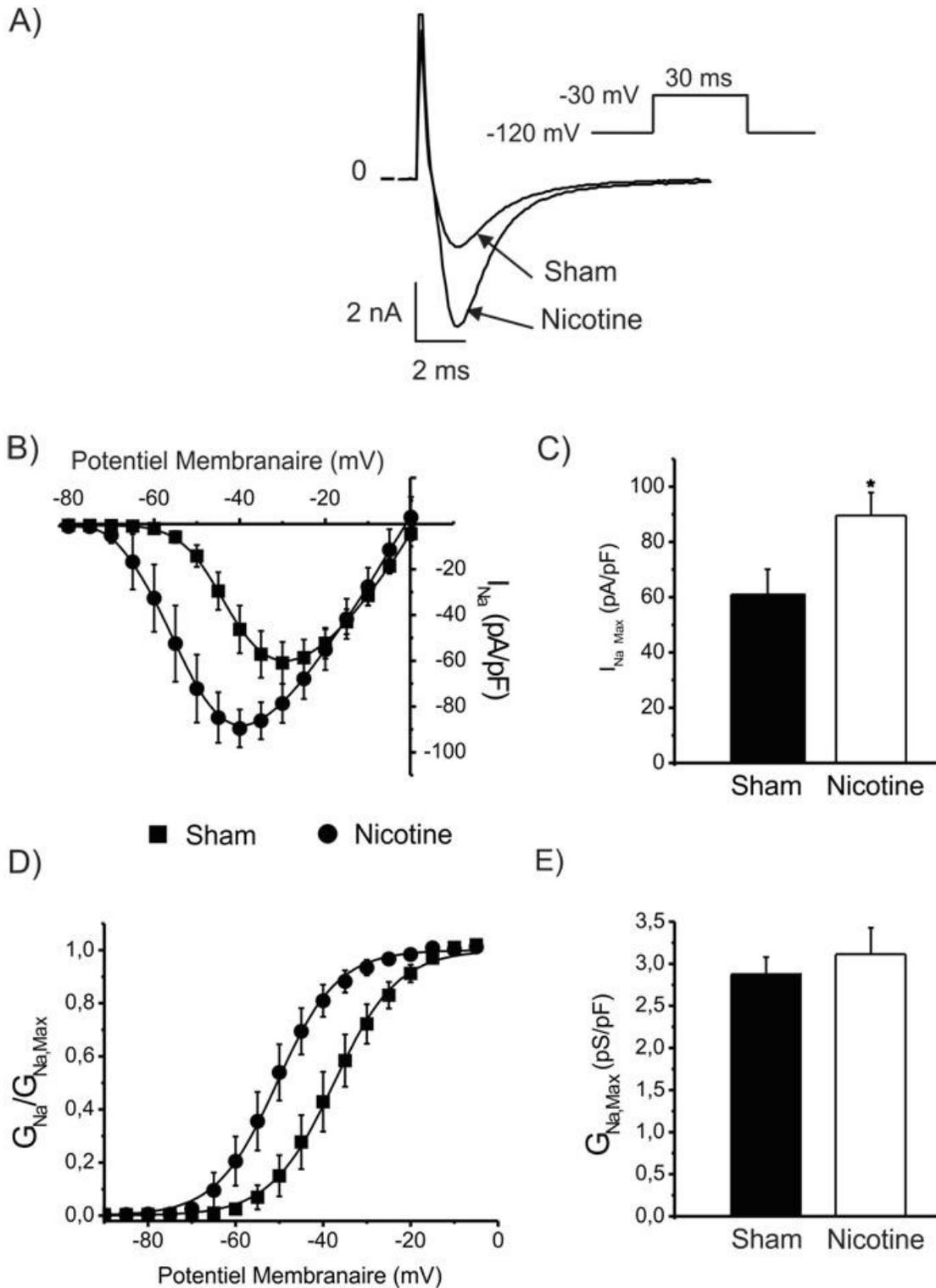
### 3.2 L'exposition *in-utero* à la nicotine chez des lapins nouveau-nés modifie les paramètres biophysiques des canaux sodiques, augmente la densité d' $I_{Na}$ et abolit les effets d'une stimulation adrénérgique

Les nouveau-nés touchés par le SMSN ne présentent pas de réflexe d'auto-ressuscitation. Dans le but de vérifier si une exposition *in-utero* à la nicotine abolit la réponse d' $I_{Na}$  à une stimulation adrénérgique, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques du courant sodique au niveau de l'oreillette droite chez des lapins nouveau-nés de 37 jours exposés ou non à la nicotine.

#### 3.2.1 L'exposition *in-utero* à la nicotine augmente la densité de courant $I_{Na}$ et décale la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs

Dans un premier temps, nous avons déterminé les propriétés biophysiques des canaux sodiques en conditions sham et nicotine. Aucune donnée concernant l'effet de la nicotine sur les canaux sodiques cardiaques n'est présente dans la littérature. Cependant, l'exposition *in-utero* à la nicotine est liée à des troubles du rythme. La **figure 3.2.1A** montre deux tracés de courants représentatifs en condition sham et nicotine. La **figure 3.2.1B** correspondant aux courbes courant-potential ( $I/V$ ) obtenues pour les différentes conditions, montre que la nicotine a augmenté l'amplitude du courant maximum d' $I_{Na}$  de 32%. En effet, la **figure 3.2.1C** montre que la densité maximale d' $I_{Na}$  augmente significativement de  $-60,9 \pm 9,2$  pA/pF à  $-89,6 \pm 8,3$  pA/pF ( $p < 0,05$ , T-test). Nos résultats montrent également qu'une exposition *in-utero* à la nicotine a décalé le seuil d'activation des canaux sodiques de  $-60$  mV à  $-75$  mV et le courant de pic  $I_{Na}$  de  $-30$  à  $-40$  mV (**Figure 3.2.1B**). Ces changements indiquent que la nicotine a modifié la dépendance au voltage des canaux sodiques, mais a également augmenté l'excitabilité cardiaque. En effet, l'excitabilité dépend de la valeur du seuil d'activation des canaux sodiques. Plus cette valeur se rapproche du potentiel membranaire de repos et plus l'excitabilité est grande. L'analyse des courbes d'activation d' $I_{Na}$  montre que la nicotine a décalé le potentiel de demi-activation des canaux sodiques de  $-37,5 \pm 0,2$  mV à  $-53,4 \pm 0,3$  mV (**Figure 3.2.1D**). En revanche, la **figure 3.2.1E** montre que la nicotine n'a pas modifié la conductance maximale des canaux sodiques

déterminée par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe I/V exprimée en densité de courant. Ces résultats indiquent que la nicotine semble avoir affecté à la fois les propriétés d'activation ainsi que le niveau d'expression des canaux sodiques. Par conséquent, l'exposition *in-utero* à la nicotine risque d'augmenter l'excitabilité cardiaque.



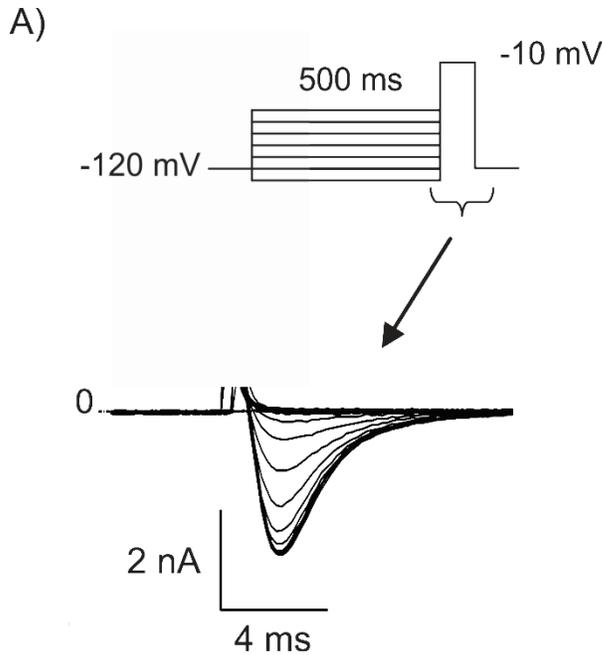
**Figure 3.2.1** L'exposition *in-utero* à la nicotine augmente l'amplitude du courant sodique et décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs chez le lapin nouveau-né de 37 jours

**A)** Tracés de courants sham et nicotine obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Le protocole au complet est composé

d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relation courant-voltage (I/V) exprimée en densité de courant (pA/pF). Les courants enregistrés ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué pour les conditions sham et nicotine. **C)** Histogramme des amplitudes maximums d' $I_{Na}$ . **D)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$ . Les courbes ont été lissées selon la formule de Boltzmann. L'exposition *in-utero* à la nicotine a significativement décalé le potentiel de demi-activation ( $p < 0.05$ , F-test). **E)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). (Sham : n=8 ; Nicotine : n=8). \* $P < 0,05$ ; T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

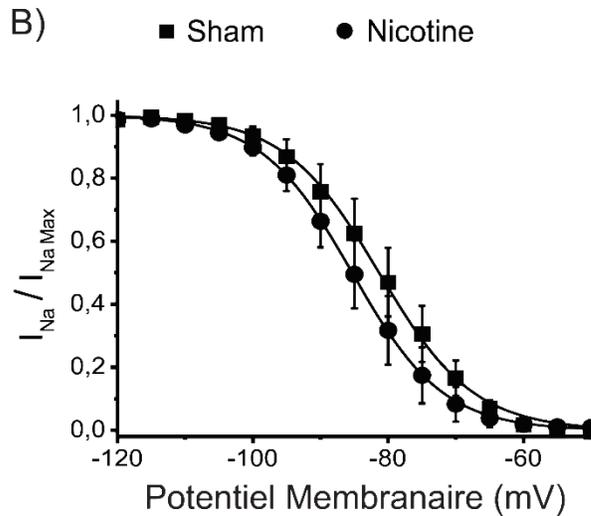
### 3.2.2 L'exposition *in-utero* à la nicotine diminue la disponibilité des canaux sodiques chez le lapin nouveau-né de 37 jours

Afin de déterminer si le décalage du pic de courant  $I_{Na}$  en condition nicotine n'était pas dû à une modification de la disponibilité des canaux sodiques, nous avons analysé la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en conditions sham et nicotine. La **figure 3.2.2A** montre le protocole de stimulation utilisé ainsi qu'un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. Les courbes d'inactivation sham et nicotine ont été obtenues selon le rapport  $(I_{Na}/I_{Na,Max})$  et lissées selon la formule de Boltzmann (**Figure 3.2.2B**). L'exposition *in-utero* à la nicotine a décalé négativement le  $V_{1/2}$  d'inactivation (F-test; Voir **Tableau 2**). Afin d'expliquer l'augmentation d' $I_{Na, Max}$  observée sur la courbe I/V, la disponibilité aurait dû être décalée vers des potentiels plus positifs. Cela signifie donc que l'augmentation du courant en condition nicotine est principalement due à un changement dans l'activation et à une possible surexpression des canaux sodiques.



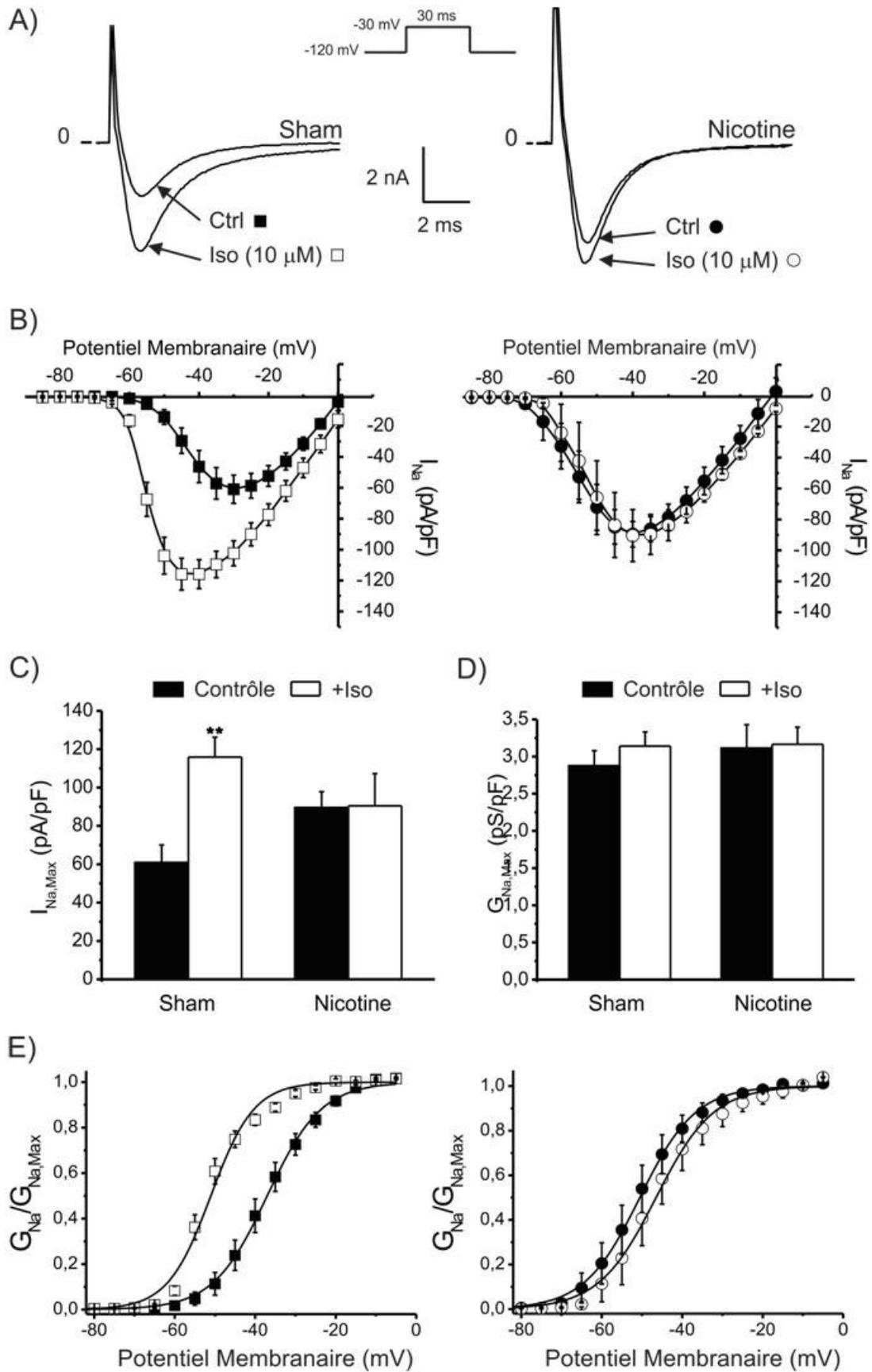
**Figure 3.2.2 L'exposition *in-utero* à la nicotine diminue la disponibilité des canaux sodiques chez le lapin nouveau-né de 37 jours**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation sham et nicotine ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=7 ; Nicotine : n=8). Valeurs  $\pm$  SEM.



### 3.2.3 L'exposition *in-utero* à la nicotine abolit les effets d'une stimulation $\beta$ -adrénergique sur $I_{Na}$

Afin de vérifier l'hypothèse d'une défaillance de la réponse adrénergique chez les lapins exposés *in-utero* à la nicotine, nous avons incubé pendant 30 minutes les cardiomyocytes isolés avec 10  $\mu$ M d'isoprotérénol. La **figure 3.2.3A** illustre les différents tracés représentatifs obtenus suite à l'application de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol en conditions sham et nicotine suivant le protocole de stimulation indiqué dans l'encart. La **figure 3.2.3B** correspond aux courbes I/V pour les deux conditions. Nos résultats montrent que l'isoprotérénol a pratiquement doublé l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  de  $-60,9 \pm 9,2$  pA/pF à  $-115,9 \pm 10,3$  pA/pF en condition sham alors qu'en condition nicotine, les deux courbes se superposent (**Figure 3.2.3C ; Tableau 2**). En condition sham, l'isoprotérénol a décalé le seuil d'activation des canaux sodiques de -5 mV, le courant de pic  $I_{Na}$  de -15 mV (**Figure 3.2.3B**) et le  $V_{1/2}$  des canaux sodiques de -14 mV (**Figure 3.2.3E**). Ces résultats indiquent que l'isoprotérénol augmente l'excitabilité en rapprochant le seuil d'ouverture des canaux sodiques du potentiel membranaire de repos. En revanche, en condition nicotine, l'isoprotérénol n'a eu aucun effet sur le  $V_{1/2}$  (**Tableau 2**). La **figure 3.2.3D** montre que l'isoprotérénol n'a pas modifié la conductance maximale des canaux sodiques (**Tableau 2**). L'isoprotérénol est connue pour augmenter l'expression des canaux sodiques via la stimulation de la PKA et PKC (Schreibmayer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Hallaq *et al.*, 2006, 2012). Une sur-stimulation de la voie sympathique en condition nicotine peut donc avoir pour effet d'augmenter chroniquement le taux d'adrénaline circulante ainsi que l'expression des canaux sodiques et par conséquent d'augmenter l'amplitude d' $I_{Na, Max}$ . En résumé, nos résultats indiquent que l'exposition *in-utero* à la nicotine abolit les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur les propriétés biophysiques d' $I_{Na}$  et que les animaux nicotines semblent être sous une dominance sympathique.



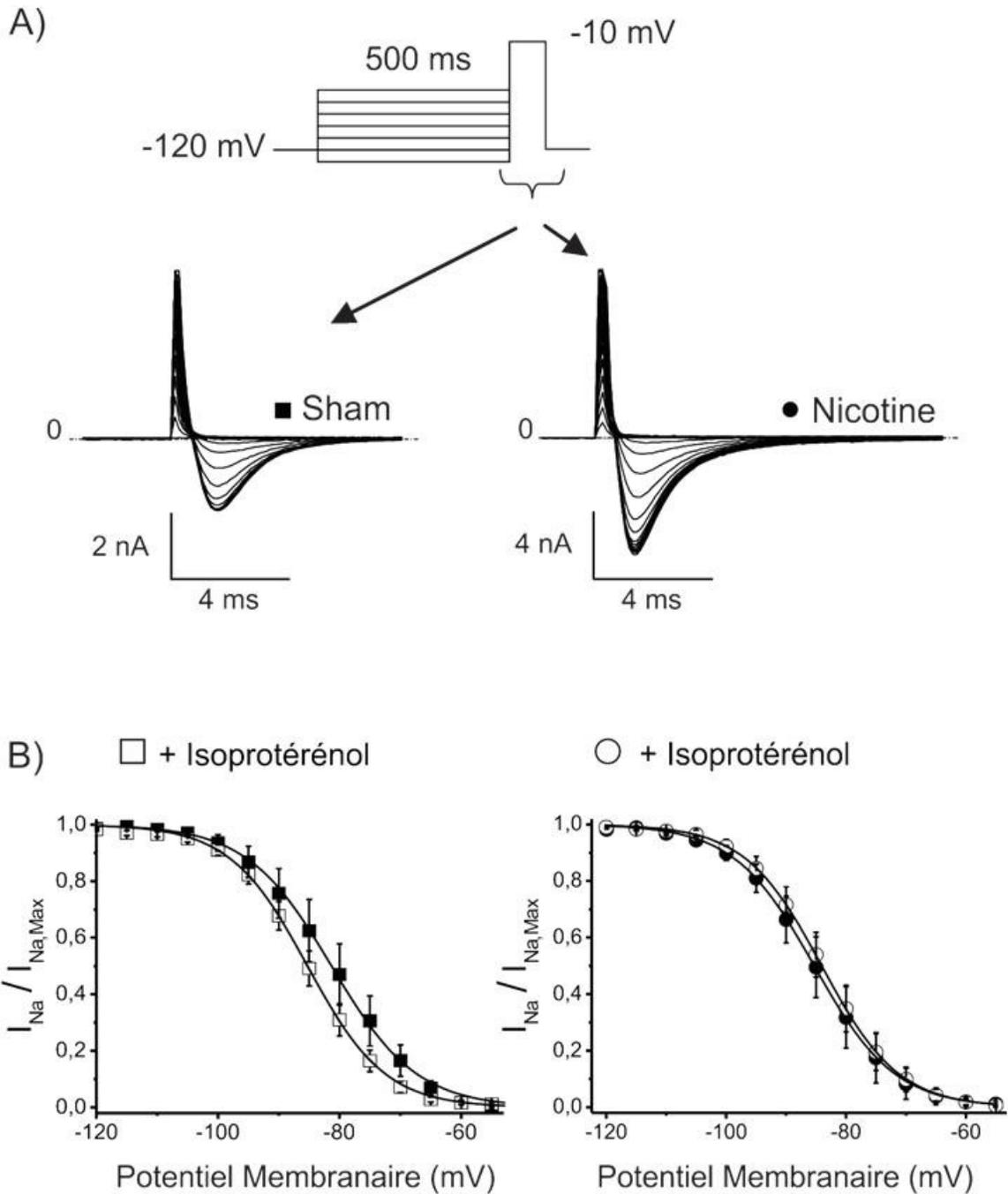
**Figure 3.2.3 L'exposition *in-utero* à la nicotine abolit les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur  $I_{Na}$**

**A)** Tracés de courants contrôles et traités (30 minutes avec 10  $\mu$ M d'isoprotérénol) pour les conditions sham et nicotine. Les courants représentés ont été obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants enregistrés ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel. **C)** Densités des courants  $I_{Na}$  maximums pour les conditions sham et nicotine avec et sans isoprotérénol. L'isoprotérénol double le courant en condition sham mais ne modifie pas l'amplitude d' $I_{Na}$  en condition nicotine. **D)** Histogramme des conductances maximales sham et nicotine pour les conditions contrôles et traités. **E)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$ . Les courbes ont été lissées selon la formule de Boltzmann. L'isoprotérénol décale significativement la courbe d'activation sham vers des potentiels plus hyperpolarisés ( $p < 0.05$ , F-test) tandis que les courbes nicotine/isoprotérénol se superposent. (Sham :  $n=8$  ; +Iso :  $n=9$  ; Nicotine :  $n=8$  ; +Iso :  $n=6$ ).  $**P < 0,01$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.2.4 L'isoprotérénol diminue la disponibilité des canaux sodiques

Hormis l'amplitude maximum d' $I_{Na}$ , les précédents résultats nous montrent que les données sham/Isoprotérénol sont très proches de celles des lapins exposés à la nicotine. Nous avons voulu déterminer si l'effet de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol entraînait, comme la nicotine, un décalage négatif de la courbe de disponibilité des canaux sodiques en condition sham afin de vérifier l'hypothèse d'une dominance sympathique. La **figure 3.2.4A** correspond aux tracés de courants représentatifs d'inactivation pour les conditions sham et nicotine obtenus grâce au protocole de stimulation schématisé au-dessus. Les courbes d'inactivation sham et nicotine ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann (**Figure 3.2.4B**). L'isoprotérénol a décalé significativement le  $V_{1/2}$  d'inactivation en condition sham, tandis que les courbes nicotine et nicotine/Isoprotérénol se superposent. Cependant, le faible décalage induit par l'isoprotérénol en condition sham est similaire à celui induit par la nicotine (cf **figure 3.2.2B**). Les valeurs des  $V_{1/2}$  pour les conditions sham/Isoprotérénol et nicotine sont respectivement de  $-85.3 \pm 0.2$  mV et  $-85.3 \pm 0.1$  mV. Toutes les valeurs des  $V_{1/2}$  sont résumées dans le **tableau 2**. Ces résultats nous indiquent donc que la nicotine abolit les effets de 10  $\mu$ M

d'isoprotérénol sur la disponibilité des canaux sodiques. En effet, le décalage de la courbe de disponibilité des canaux sodiques induit par une exposition *in-utero* à la nicotine est identique à celui induit par 10  $\mu$ M d'isoprotérénol en condition sham. Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse d'un état de dominance sympathique chez les animaux exposés *in-utero* à la nicotine.



**Figure 3.2.4 L'isoprotérénol diminue pas la disponibilité des canaux sodiques**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif pour les conditions sham et nicotine non exposés à 10  $\mu$ M d'isoprotérénol où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=7 ; +Iso : n= 8 ; Nicotine : n=8 ; +Iso : n=7). Valeurs  $\pm$  SEM.

	Sham		Nicotine	
	Contrôle	Isoprotérénol	Contrôle	Isoprotérénol
$I_{Na}$ , pA/pF	-60,9 $\pm$ 9,2	-115,9 $\pm$ 10,3 <sup>††</sup>	-89,6 $\pm$ 8,3*	-90,5 $\pm$ 16,8
$G_{Na, Max}$ , pS/pF	2.9 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	3.1 $\pm$ 0,3	3.2 $\pm$ 0.2
<b>Activation</b>				
$V_{1/2}$ , mV	-37.0 $\pm$ 0.2	-51.0 $\pm$ 0.9 <sup>†</sup>	-49.5 $\pm$ 0.3*	-46.5 $\pm$ 0.4
k, mV	6.7 $\pm$ 0.2	5,4 $\pm$ 0,4	7.7 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3
<b>Inactivation</b>				
$V_{1/2}$ , mV	-81.3 $\pm$ 0.2	-85.3 mV $\pm$ 0.2*	-85.3 $\pm$ 0.1*	-84.1 mV $\pm$ 0.1
k, mV	6.9 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.1

**Tableau 2 Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions sham et nicotine**

$I_{Na}$  correspond au courant sodique ;  $G_{Na, Max}$  à la conductance maximum ;  $V_{1/2}$  au potentiel de demi-(in)activation ; k au facteur de pente de l'(in)activation ;  $\tau_r$  et  $\tau_l$  aux constantes de temps rapide et lente de la réactivation. \* $P$ <0.05 nicotine vs sham, T-test et F-test; <sup>††</sup> $P$ <0.01 isoprotérénol vs contrôle, T-test et <sup>†</sup> $P$ <0.05 iso vs contrôle F-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

*En résumé, nous avons montré qu'une exposition in-utéro à la nicotine modifiait les paramètres d'activation des canaux sodiques et augmentait l'excitabilité cardiaque (décalage négatif de la relation courant-potentiel). Le seuil d'activation des canaux sodiques et le pic de courant sont respectivement décalés de -15 mV et -10 mV chez les lapins exposés à la nicotine. Nous avons également étudié la réponse adrénergique en appliquant 10  $\mu$ M d'isoprotérénol afin de vérifier l'hypothèse de l'étude. Nos résultats montrent que l'isoprotérénol double la densité*

*de courant et décale la courbe d'activation des canaux sodiques de -12 mV chez les lapins sham. En revanche, les lapins exposés à la nicotine ne répondent pas à une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Cependant, il est important de noter que les valeurs des conductances maximales et des  $V_{1/2}$  ( $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ ) sham / +Isoprotérénol sont similaires aux valeurs obtenues en condition nicotine. Ils semblent donc qu'une exposition in-utero à la nicotine soit responsable d'une augmentation chronique des taux d'adrénaline et de nor-adrénaline ayant pour conséquence d'activer de façon permanente les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ces résultats pourraient expliquer en partie l'origine du SMSN qui serait notamment due à la présence d'une dominance sympathique et à une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergique.*

### **3.3 L'épilepsie augmente la densité du courant $I_{Na}$ , augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ et modifie l'activité des protéines kinases A et C sur les paramètres biophysiques des canaux sodiques**

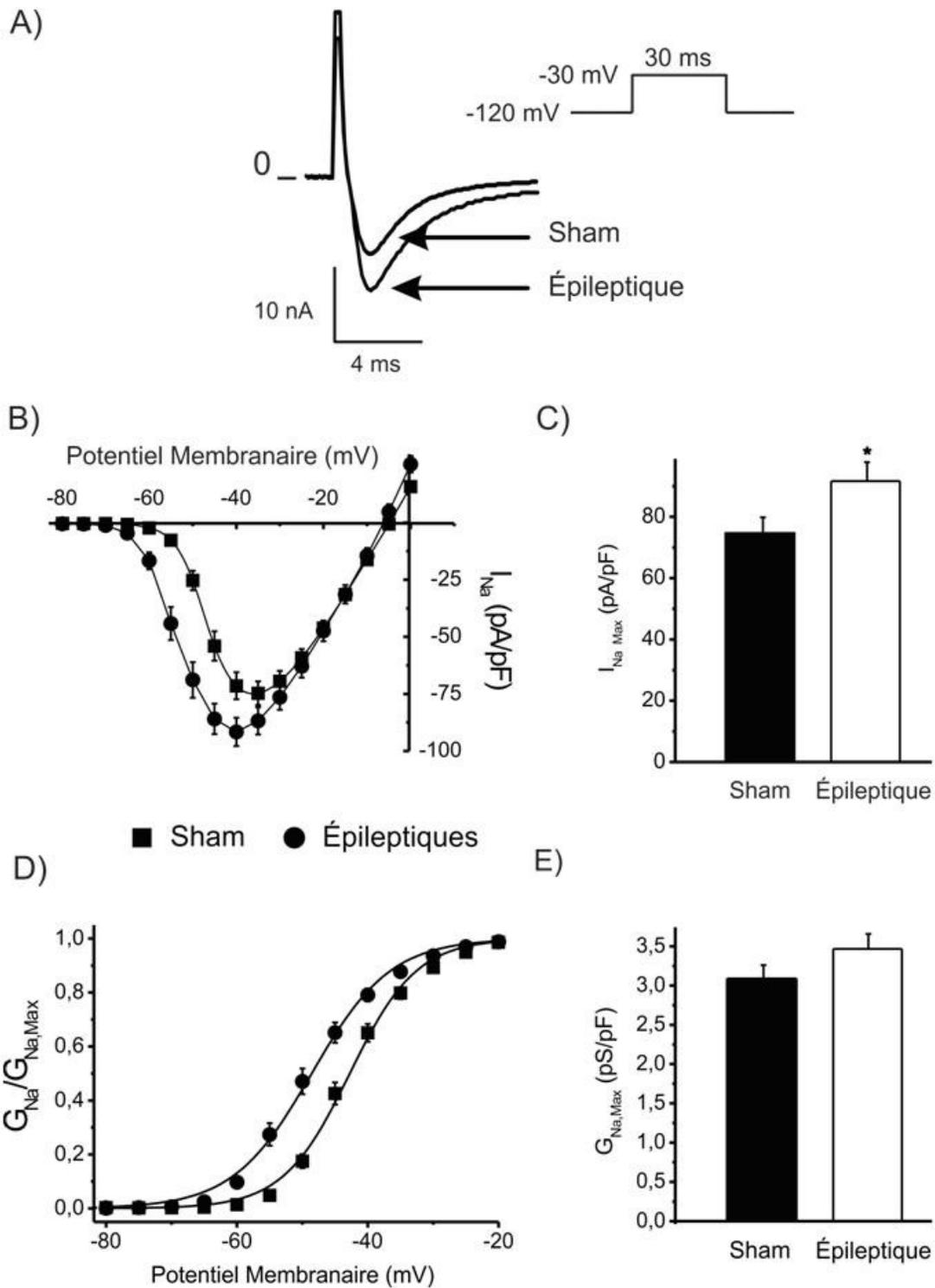
Post ictus, certains patients épileptiques présentent au niveau cardiaque des bradycardies, des blocs de conduction ainsi qu'un intervalle QT allongé pouvant mener aux MSIE. Ces paramètres sont influencés par les canaux sodiques. En effet, une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  ainsi qu'une diminution de la disponibilité des canaux sodiques peuvent respectivement augmenter la DPA et ralentir la conduction de l'influx électrique et favoriser l'apparition de BAV. De telles modifications peuvent entraîner l'apparition d'arythmies létales comme des torsades de pointes. Afin de déterminer les effets de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques cardiaques, nous avons utilisé un modèle de rats présentant un SE. De plus, le développement des bradycardies indique que le tonus sympatho-vagal est également modifié post ictus chez les patients épileptiques. Les stimulations sympathiques et parasympathiques activent respectivement les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et muscariniques qui sont des récepteurs couplés à des protéines G respectivement activatrice et inhibitrice. Selon la voie qui est activée, cela va engendrer une activation ou inhibition des PKA et PKC qui sont des protéines kinases connues pour modifier le niveau d'expression et les paramètres biophysiques des canaux sodiques. Afin d'étudier l'hypothèse d'une modification du tonus sympatho-vagal induite par l'épilepsie, nous avons également analysé les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique et évalué l'influence de la PKA et PKC sur le courant  $I_{Na}$ .

#### **3.3.1 L'épilepsie augmente l'excitabilité cardiaque, diminue la disponibilité et réduit le temps de réactivation des canaux sodiques**

##### ***3.3.1.1 L'épilepsie augmente la densité de courant $I_{Na}$ et décale la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs***

L'épilepsie est caractérisée par une hyperactivité cérébrale et la survenue d'arythmies cardiaques parfois létales. Afin de vérifier la possible implication du

courant sodique dans la genèse de ces arythmies, nous avons tout d'abord étudié les densités de courant ainsi que les paramètres d'activation des canaux sodiques chez des rats sham et épileptique. La **figure 3.3.1.1A** montre deux tracés de courants représentatifs en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.1.1B** correspondant aux relations courant-potentiel (I/V) obtenues pour les différentes conditions, montre que l'épilepsie a augmenté l'amplitude du courant maximum d' $I_{Na}$  d'environ 18%. En effet, la **figure 3.3.1.1C** montre que la densité maximale d' $I_{Na}$  a significativement augmenté de  $-74,7 \pm 5,1$  pA/pF à  $-91,6 \pm 6,2$  pA/pF ( $p < 0.05$ , T-test). Nos résultats montrent également que l'épilepsie a décalé à la fois le seuil d'activation des canaux sodiques et le courant de pic  $I_{Na}$  de  $-5$  mV (**Figure 3.3.1.1B**). Ces changements indiquent que l'épilepsie a modifié la dépendance au voltage des canaux sodiques. L'analyse des courbes d'activation d' $I_{Na}$  montre que l'épilepsie a décalé le  $V_{1/2}$  de  $-42.8 \pm 0.3$  mV à  $-48.6 \pm 0.3$  mV (**Figure 3.3.1.1D**). Enfin, la **figure 3.3.1.1E** montre que l'épilepsie n'a pas modifié la conductance maximale des canaux sodiques. Ces résultats indiquent que l'épilepsie a augmenté l'excitabilité cardiaque en modifiant les propriétés d'activation des canaux sodiques (décalage négatif de la courbe  $m_{\infty}$ ) ainsi que la densité de courant. L'augmentation de la densité peut avoir deux explications. Premièrement, le décalage négatif de la courbe  $m_{\infty}$  peut expliquer cette augmentation. À  $-40$  mV par exemple, il y a plus de canaux activés en condition épileptique comparativement aux sham (**Figure 3.3.1.1D**), ce qui peut expliquer la plus grande amplitude d' $I_{Na}$  pour ce même voltage (**Figure 3.3.1.1B**). Deuxièmement, l'augmentation de la densité de courant peut être due à une surexpression de canaux sodiques. L'apparition de bradycardie étaye l'hypothèse d'un déséquilibre du tonus sympatho-vagal chez les patients épileptiques. Par conséquent, un dérèglement de ce tonus entraîne alors une modification de l'activité de PKA et PKC qui sont des protéines kinases pouvant modifier les paramètres biophysiques et le niveau d'expression des canaux sodiques (Schreibmayer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Hallaq *et al.*, 2006, 2012).



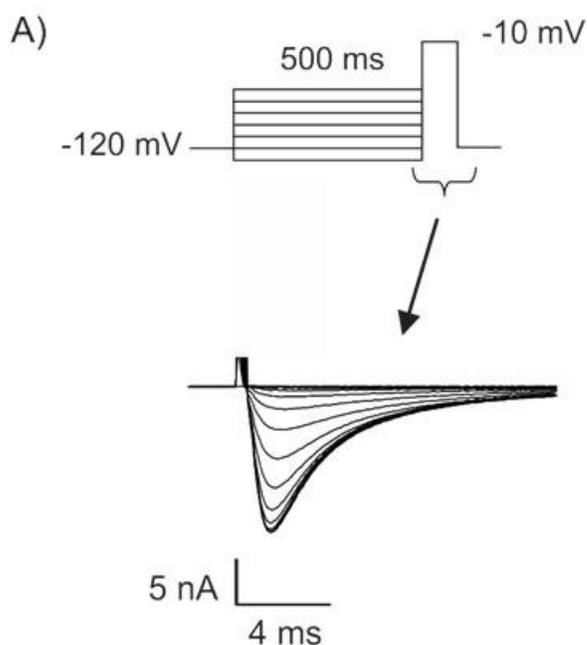
**Figure 3.3.1.1 L'épilepsie augmente l'amplitude du courant sodique et décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs**

**A)** Tracés de courants sham et épileptique obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage ( $I/V$ ) exprimées

en densité de courant (pA/pF). Les courants de pic ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué pour les conditions sham et épileptique. **C)** Histogramme des amplitudes maximums d' $I_{Na}$ . L'épilepsie augmente significativement  $I_{Na, Max}$ . **D)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. L'épilepsie décale significativement le potentiel de demi-activation vers des potentiels plus hyperpolarisés ( $p < 0.05$ , F-test). **E)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). (Sham :  $n=21$  ; Épileptiques :  $n=35$ ). \* $P < 0.05$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

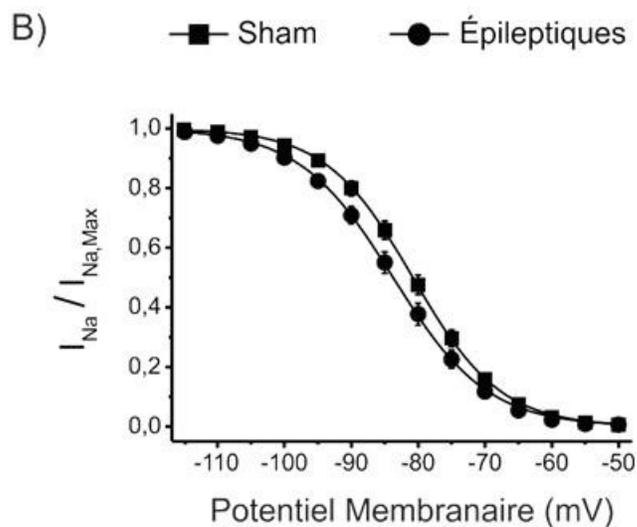
### 3.3.1.2 L'épilepsie diminue la disponibilité des canaux sodiques

Un changement dans la disponibilité des canaux sodiques pourrait être responsable du décalage du pic de courant sodique observé en condition épileptique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique. La **figure 3.3.1.2A** correspond au protocole de stimulation utilisé et montre un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. Les courbes d'inactivation sham et épileptique ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann (**Figure 3.3.1.2B**). L'épilepsie a faiblement, mais significativement décalé le potentiel de demi-inactivation de  $-80,8 \pm 0,1$  mV à  $-83.8 \pm 0.1$  mV. La disponibilité des canaux sodiques est donc réduite pour des potentiels plus dépolarisés en condition épileptique. Ce résultat ne permet pas d'expliquer l'augmentation d' $I_{Na, Max}$  observé sur la courbe I/V. Cela signifie donc que l'augmentation du courant en condition épileptique est principalement due à un changement dans l'activation et à une possible surexpression des canaux sodiques.



### Figure 3.3.1.2 L'épilepsie diminue la disponibilité des canaux sodiques

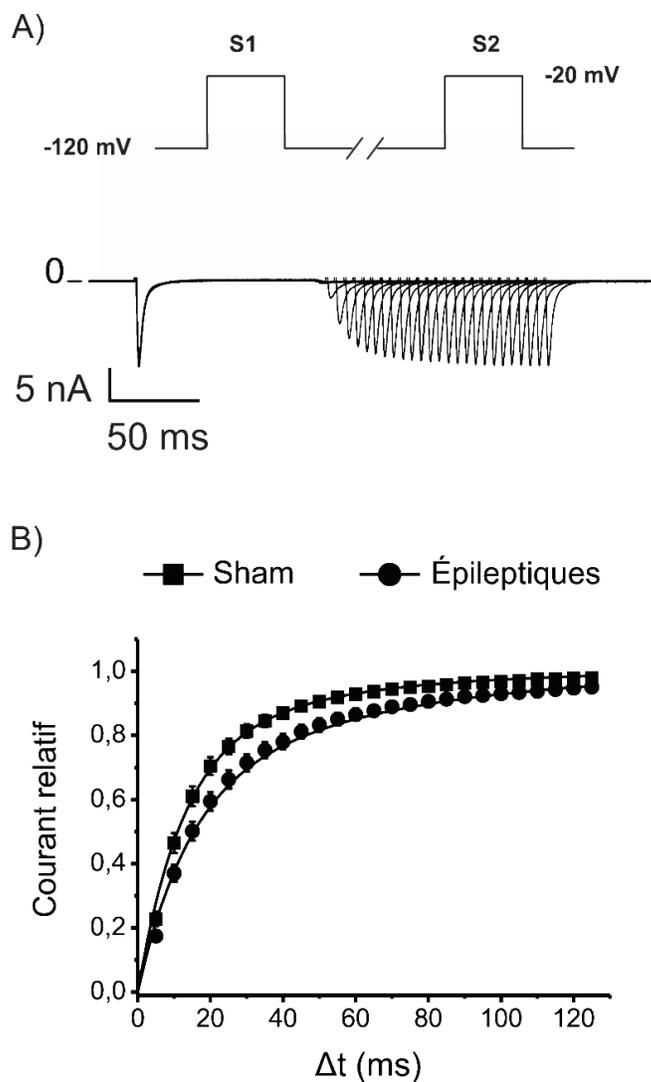
**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation sham et épileptique ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ). Les courbes ont été lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham :  $n=21$  ; Épileptique :  $n=17$ ). ( $p<0.05$ , F-test). Valeurs  $\pm$  SEM



### 3.3.1.3 L'épilepsie augmente le temps de réactivation des canaux sodiques

Des enregistrements d'ECG de patients en pleine crise d'épilepsie ont révélé l'apparition de bradycardies suivies parfois de blocs de conduction. Un bloc de conduction se traduit sur un ECG par une dissociation de l'onde P du complexe QRS. Le nœud auriculo-ventriculaire (AV) joue un rôle de péage et régule la transmission de l'influx électrique entre les oreillettes et les ventricules. Dans un cas de BAV, l'influx électrique provenant des oreillettes n'engendre pas systématiquement une contraction des ventricules. Un défaut dans les propriétés de réactivation des canaux sodiques peut être responsable de ce genre d'anomalie. En effet, si le temps de réactivation d'un canal augmente, la stimulation suivante sera retardée. Combinées avec une augmentation de l'excitabilité, de telles modifications peuvent perturber le bon fonctionnement du nœud AV et être responsables de l'apparition de bloc de conduction. Dans le but de vérifier si l'épilepsie modifie le temps de réactivation des canaux sodiques, nous avons utilisé un protocole standard de double pulse. Plus précisément, le protocole est composé d'un double pulse test (S1-S2) à -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms afin de mesurer le temps de réactivation des canaux sodiques à partir des états inactivés. La **figure 3.3.1.3A** montre un tracé de courant représentatif obtenu grâce au protocole de stimulation illustré dans l'encart. La **figure 3.3.1.3B** correspond aux courbes de réactivation en conditions sham et épileptique. La fraction de courant réactivable (courant relatif) est exprimée en fonction de l'intervalle de temps ( $\Delta t$ ). Les courbes ont été obtenues suite à un lissage double exponentiel. Les valeurs des constantes de temps rapide ( $\tau_r$ ) associées aux amplitudes  $A_r$  exprimées en pourcentage sont respectivement de  $12.17 \pm 0.29$  ms (~75%) et  $13.64 \pm 0.39$  (~60%) ms pour les conditions sham et épileptique. Les valeurs des constantes de temps lentes ( $\tau_l$ ) associées aux amplitudes  $A_l$  exprimées en pourcentage sont respectivement de  $44.2 \pm 1.76$  ms (~25%)  $\pm$  et  $57.99 \pm 1.28$  ms (~40%) pour les conditions sham et épileptiques. Pour un même intervalle de temps, l'épilepsie diminue la quantité de canaux réactivés. Nos résultats renforcent l'hypothèse énoncée auparavant et montrent que l'épilepsie augmente le temps de réactivation des canaux sodiques pouvant

être à l'origine de l'apparition de BAV. Puisque la conduction semble être ralentie en condition épileptique, ces résultats s'opposent donc à l'augmentation de l'excitabilité cardiaque, mais sont en revanche compatibles avec le développement de bradycardie et de BAV.



### Figure 3.3.1.3 L'épilepsie augmente le temps de réactivation des canaux sodiques

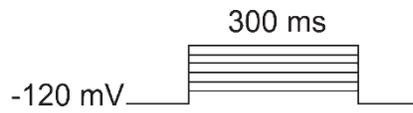
**A)** Protocole standard double pulse (S1-S2) de -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms utilisé afin de mesurer le temps de réactivation des canaux sodiques à partir des états inactivés. **B)** Courbes de réactivation pour les conditions sham et épileptique. Les courbes ont été obtenues selon le rapport:  $I_{Na}$  (S2/S1) en fonction de  $\Delta t$  et lissées par une fonction double exponentielle. (Sham:  $n=22$ ; Épileptique:  $n=33$ ). Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.3.2 L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ ainsi que la participation des nNavs à $I_{NaL}$

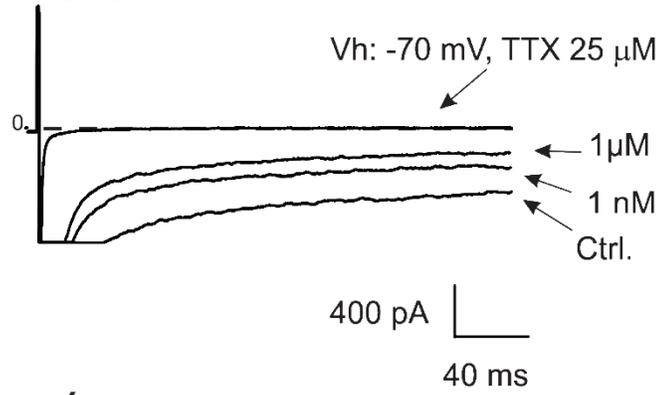
Certains patients épileptiques dépourvus de mutations ont également la particularité de présenter un intervalle QT allongé. Le courant  $I_{NaL}$  participe à la phase de plateau du PA et peut donc moduler la durée de repolarisation et être à l'origine de l'allongement de l'intervalle QT. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'amplitude d' $I_{NaL}$  en conditions sham et épileptique. Le courant  $I_{NaL}$  est généré par différents types de canaux sodiques au niveau cardiaque : NaV1.5 et les nNavs. Il est possible de discriminer ces deux types de courants grâce à leurs différentes affinités pour la TTX. Dans le but de déterminer si l'épilepsie modifiait également la participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{NaL}$ , nous avons utilisé différentes concentrations de TTX afin de bloquer séparément les canaux sodiques TTX-sensibles (nNavs, 1nM) et TTX-résistants (NaV1.5, 1  $\mu$ M). La ligne de zéro courant est obtenue suite à la perfusion de 25  $\mu$ M de TTX et à l'utilisation d'un potentiel membranaire de -70 mV. Avant de présenter les résultats obtenus concernant  $I_{NaL}$ , deux précisions doivent être apportées. Premièrement, toutes les valeurs d' $I_{NaL}$  exprimées en densités de courant (pA/pF) et présentées dans les **figures 3.3.2.1 et 3.3.2.2** ont été obtenues suite à la soustraction du courant résiduel (zéro courant) au courant total mesuré. Les résultats présentés ci-dessous reflètent donc l'amplitude réelle d' $I_{NaL}$  dans les différentes conditions étudiées. Deuxièmement, chaque cellule est son propre contrôle, ce qui signifie que les valeurs d'amplitudes d' $I_{NaL}$  contrôle, 1nM, 1 $\mu$ M et 25  $\mu$ M ( $V_h$  : -70 mV) ont été obtenues sur la même cellule. La **figure 3.3.2.1A** montre deux tracés de courant  $I_{NaL}$  contrôle et après perfusion des différentes concentrations de TTX obtenus grâce au protocole de stimulation illustré dans l'encart. La **figure 3.3.2.1B** montre les différentes densités de courant maximales d' $I_{NaL}$  obtenues pour un potentiel membranaire de -10 mV en fonction de la concentration de TTX appliquée. Nos résultats montrent que l'épilepsie a significativement augmenté l'amplitude maximale d' $I_{NaL}$  de  $1.5 \pm 0.2$  pA/pF à  $2.3 \pm 0.3$  pA/pF. La **figure 3.3.2.1B** montre également que l'épilepsie modifie de façon significative la participation des canaux TTX-sensibles (nNavs) à  $I_{NaL}$ . En effet,

après l'application de 1 nM de TTX, l'amplitude du courant soutenu est diminuée de 35% en condition sham alors qu'en condition épileptique, le courant est diminué de 49%. Après l'ajout de 1 nM de TTX, les valeurs d' $I_{NaL}$  obtenues ne sont pas significativement différentes (**Tableau 3**) entre les conditions sham et épileptique. La fraction de courant insensible à 1 nM de TTX est donc la même dans les deux conditions. Enfin, l'épilepsie n'a pas modifié l'effet de 1  $\mu$ M de TTX sur l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Les valeurs obtenues sont très proches puisqu'elles sont de  $0.6 \pm 0.2$  pA/pF pour les deux conditions. L'épilepsie ne modifie donc pas la participation de NaV1.5 à  $I_{NaL}$ , mais en revanche augmente le taux de participation des nNaVs.

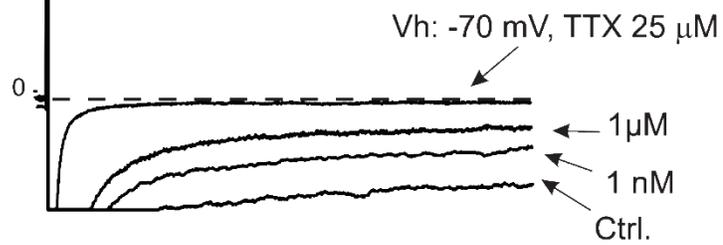
A)



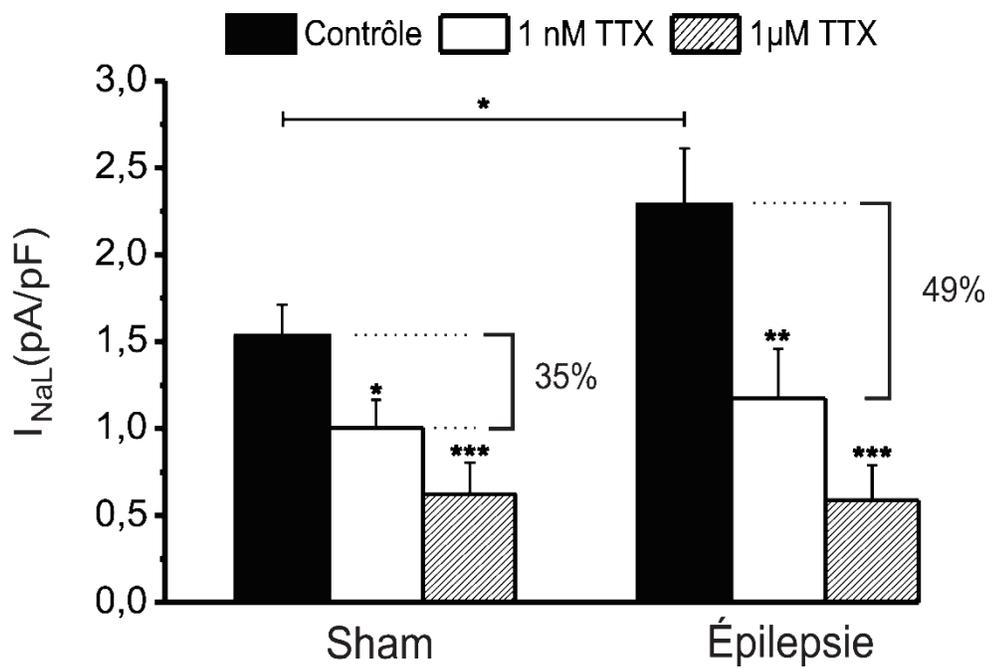
Sham



Épileptique



B)

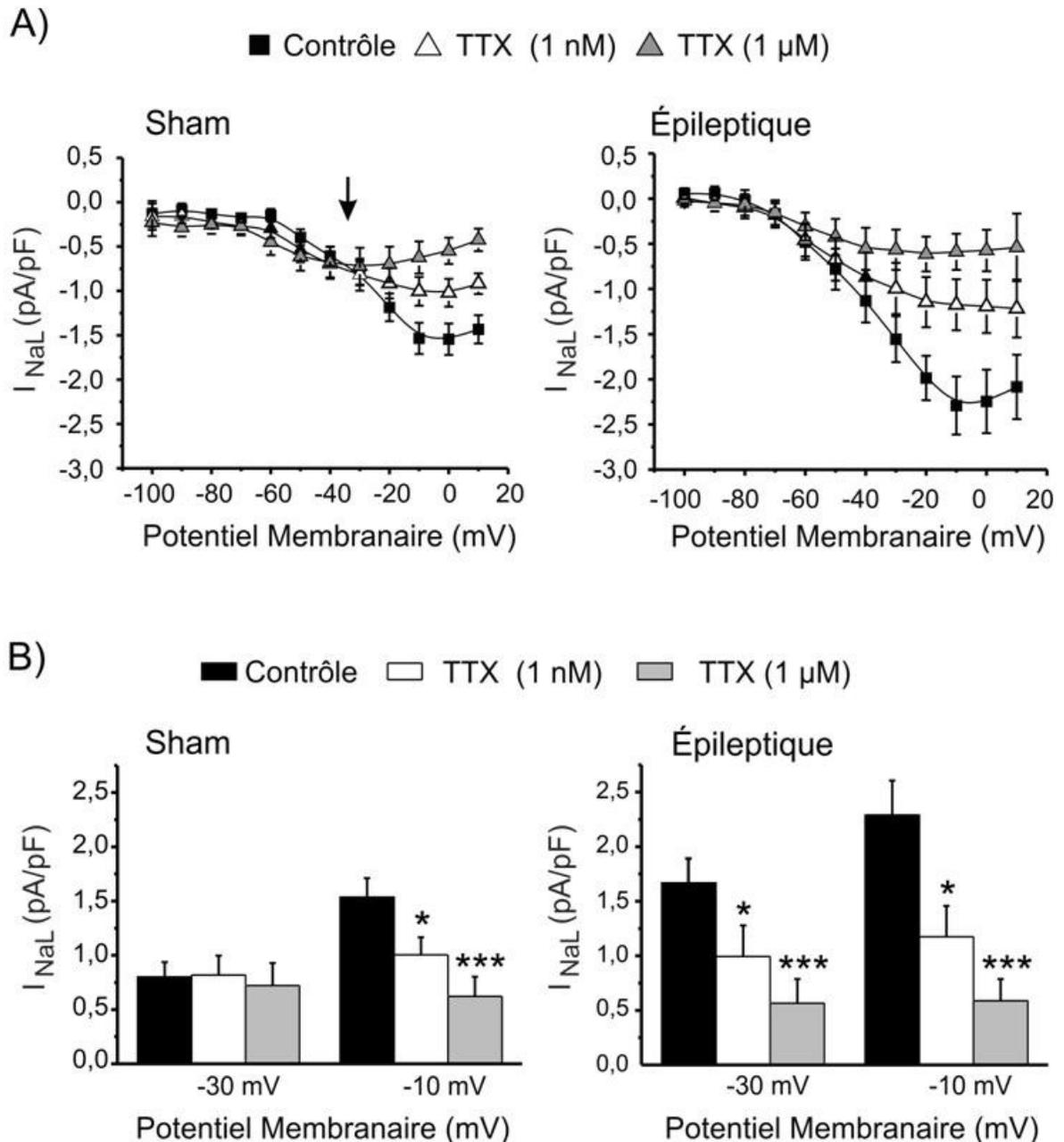


**Figure 3.3.2.1 L'épilepsie augmente l'amplitude de la composante soutenue du courant sodique ainsi que la contribution des canaux sodiques TTX-sensibles**

**A)** Tracés de courants  $I_{NaL}$  contrôlés, après ajout de 1 nM et 1  $\mu$ M de TTX. La ligne de base (valeur du courant égale à zéro) est obtenue suite à l'utilisation de 25  $\mu$ M de TTX et d'un potentiel membranaire de maintien ( $V_h$ ) de -70 mV. L'encart correspondant au protocole de stimulation utilisé afin de mesurer  $I_{NaL}$  consiste en une suite de stimulations maintenues pendant 300 ms de -100 mV à +20 mV par incrément de 10 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Les amplitudes d' $I_{NaL}$  ont été mesurées à la fin des 300 ms. **B)** Histogramme des densités maximums du courant sodique  $I_{NaL}$  en fonction de la concentration de TTX perfusée. L'amplitude maximale est obtenue pour une valeur de potentiel de -10 mV pour les conditions sham et épileptique. (Sham : n=13 ; Épileptique : n=11). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM

La **figure 3.3.2.2A** montre les relations courant/voltage obtenues pour les conditions sham et épileptique. Toutes les amplitudes d' $I_{NaL}$  ont été prises à la fin des 300 ms afin de mesurer uniquement la composante soutenue du courant sodique. En condition sham, nos résultats montrent que la TTX diminue l'amplitude du courant pour des potentiels membranaires compris entre -30 et +10 mV. En revanche, en condition épileptique, nos résultats montrent que la TTX diminue l'amplitude du courant sur une gamme de potentiels membranaires plus grande comprise entre -60 et +10 mV. Lorsque l'on compare les courbes I/V sham et épileptique, on peut s'apercevoir que la courbe sham présente un point d'inflexion pour une valeur de potentiel de -30 mV. En effet,  $I_{NaL}$  ne présente aucune sensibilité à la TTX pour les potentiels membranaires compris entre -100 et -30 mV, tandis qu'entre -30 et +10 mV le courant décroît progressivement suivant la dose de TTX utilisée. Ces résultats illustrent parfaitement les différences existantes entre les canaux NaV1.5 et les nNaVs. Le pic de courant de NaV1.5 se situe à -30 mV et est résistant à la TTX, tandis que le pic de courant des nNaVs se situe entre 0 et +10 mV et est très sensible à la TTX. Les différences d'amplitudes d' $I_{NaL}$  entre les animaux shams et épileptiques ainsi que les différentes sensibilités à la TTX indiquent que l'épilepsie a induit un remodelage ionique en faveur des canaux sodiques sensibles à de faibles concentrations de TTX (nNaVs). Malgré l'absence de point d'inflexion sur la courbe I/V épileptique, le maximum de courant  $I_{NaL}$  a été obtenu pour une même valeur de potentiel (-10 mV) dans les deux conditions. La **figure 3.3.2.2B** montre les différentes densités de courant obtenues en conditions sham et épileptique pour des potentiels membranaires de -30 et -10

mV. Ces potentiels ont été choisis, car ils correspondent respectivement au maximum de courant pour les canaux NaV1.5 et les nNaVs. En condition sham, nos résultats montrent que contrairement au pic de -30 mV, le courant obtenu à -10 mV présente une sensibilité à 1 nM et 1  $\mu$ M de TTX. En revanche, en condition épileptique, les amplitudes d' $I_{NaL}$  mesurées à -30 et -10 mV s'avèrent être significativement bloquées par 1nM et 1  $\mu$ M de TTX. Nos résultats montrent donc que l'épilepsie entraîne une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  en augmentant la contribution des nNaVs. Ces résultats renforcent les observations faites sur les ECG de patients épileptiques et étayent l'hypothèse de l'implication d' $I_{NaL}$  dans l'allongement de l'intervalle QT.



**Figure 3.3.2.2 L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  ainsi que la contribution des nNaVs sur une large gamme de potentiels membranaires**

**A)** Relations courant-voltage d' $I_{NaL}$  exprimées en densité de courant (pA/pF) pour les conditions sham et épileptique contrôle et après perfusion de 1 nM et 1 µM de TTX. L'épilepsie augmente l'amplitude totale d' $I_{NaL}$ . **B)** Histogramme représentant le maximum de densité de courant en condition sham et épileptique (mesuré à 300 ms) en fonction du potentiel membranaire et de la concentration de TTX appliquée. En condition sham (histogramme de gauche), le courant obtenu pour un potentiel de -30 mV ne présente aucune sensibilité à la TTX contrairement au pic de -10 mV. En condition épileptique (histogramme de droite), l'ensemble des courants obtenus pour les potentiels de -30 et -10 mV est sensible à 1 nM et 1 µM de TTX. (Sham : n=13 ; Épileptique : n=11).

	Sham			Épileptique		
	Contrôle	1 nM TTX	1 $\mu$ M TTX	Contrôle	1 nM TTX	1 $\mu$ M TTX
<b>-30 mV (pA/pF)</b>	-0.8 $\pm$ 0.1	-0.8 $\pm$ 0.2	-0.7 $\pm$ 0.2	-1.6 $\pm$ 0.3	-1.0 $\pm$ 0.3*	-0.6 $\pm$ 0.2***
<b>-10 mV (pA/pF)</b>	-1.5 $\pm$ 0.2	-1.0 $\pm$ 0.2*	-0.6 $\pm$ 0.2***	-2.3 $\pm$ 0.3	-1.2 $\pm$ 0.3**	-0.6 $\pm$ 0.2***

**Tableau 3 Amplitudes du courant  $I_{NaL}$  exprimées en pA/pF selon la concentration de TTX perfusée pour les conditions sham et épileptique**

Les valeurs correspondent à l'amplitude d' $I_{NaL}$  suite à la soustraction du courant résiduel. Les valeurs de potentiels membranaires de -30 et -10 mV correspondent respectivement aux maximums de courant pour les canaux sodiques de type NaV1.5 et nNaVs. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 TTX vs contrôle, T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

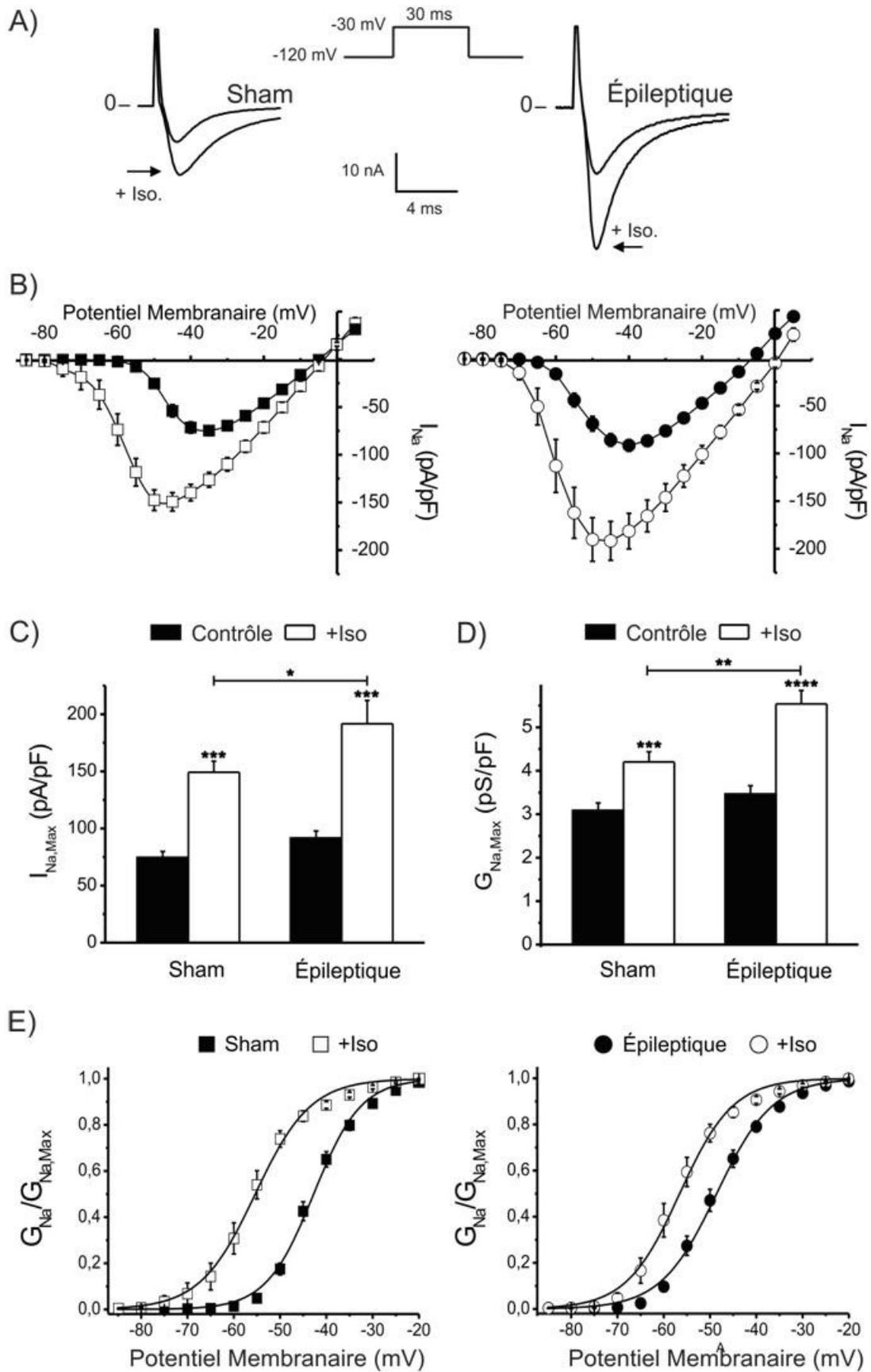
### 3.3.3 L'épilepsie diminue la réponse à une stimulation $\beta$ -adrénergique

#### 3.3.3.1 L'épilepsie ne modifie pas l'effet d'une stimulation $\beta$ -adrénergique sur le courant $I_{Na, Max}$ , mais réduit le décalage de la courbe d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs

L'augmentation d' $I_{Na, Max}$  observée dans la **figure 3.3.3.1C** en condition épileptique ne peut pas entièrement être expliquée par une augmentation de la participation ou expression des nNaVs. En effet, les nNaVs participent à hauteur de 10 % du courant pic sodique. L'augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  observée en condition épileptique n'est donc pas suffisante pour être responsable de l'augmentation d' $I_{Na, Max}$ . Cependant, la répétition de crises peut chroniquement entraîner un remodelage du système autonome vers une dominance sympathique et entraîner une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons exposé des cardiomyocytes de rats sham et épileptiques à 10  $\mu$ M d'isoprotérénol qui est un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La **figure 3.3.3.1A** montre deux tracés de courants représentatifs d' $I_{Na, Max}$  en condition sham et épileptique avec et sans isoprotérénol. La **figure 3.3.3.1B** correspondant aux relations courant-potentiel ( $I/V$ ) obtenues pour les

différentes conditions montre que l'isoprotérénol a augmenté l'amplitude du courant d' $I_{Na, Max}$  d'environ 50% et 52% respectivement pour les conditions sham et épileptique. En effet, les valeurs de densités maximales après ajout d'isoprotérénol sont significativement augmentées et sont de  $-149.2 \pm 9.7$  pA/pF et de  $-191,6 \pm 20.5$  pA/pF (**Figure 3.3.3.1C**,  $p < 0.001$ , T-test). Nos résultats montrent également que l'isoprotérénol n'a pas eu les mêmes effets sur le seuil d'activation des canaux sodiques et le courant de pic  $I_{Na}$  en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.3.1B** montre que l'isoprotérénol a décalé le pic d' $I_{Na}$  de -10 et -5 mV ainsi que le seuil d'activation des canaux sodiques de -15 et -5 mV respectivement pour les conditions sham et épileptique. Cependant, dans les deux conditions, l'isoprotérénol a décalé le pic d' $I_{Na}$  à une valeur de -45 mV. Ces changements indiquent que l'isoprotérénol modifie la dépendance au voltage des canaux sodiques et que son effet est réduit en condition épileptique. En revanche, la **figure 3.3.3.1C** montre que l'épilepsie ne limite pas l'effet de l'isoprotérénol sur  $I_{Na, Max}$  puisque l'augmentation de courant observée en condition épileptique est significativement plus importante que celle observée en condition sham ( $p < 0.05$ , T-test). Dans nos conditions expérimentales, l'épilepsie ne semble pas désensibiliser les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La **figure 3.3.3.1D** montre que l'isoprotérénol a significativement augmenté la conductance maximale de  $3.1 \pm 0.2$  pS/pF à  $4.2 \pm 0.2$  pS/pF et de  $3.5 \pm 0.2$  pS/pF à  $5.5 \pm 0.3$  pS/pF respectivement pour les conditions sham et épileptique. L'analyse des courbes d'activation d' $I_{Na}$  montre que l'isoprotérénol a significativement décalé le  $V_{1/2}$  de  $-42.8 \pm 0.3$  mV à  $-55.4 \pm 0.3$  mV et de  $-48.6 \pm 0.3$  mV à  $-56.6 \pm 0.3$  mV respectivement pour les conditions sham et épileptique (**Figure 3.3.3.1E**,  $p < 0.05$ , F-test). Après ajout de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol, les valeurs des  $V_{1/2}$  sham et épileptique ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ , F-test). Le plus faible décalage observé en condition épileptique signifie que l'épilepsie diminue l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur les paramètres d'activation des canaux sodiques et que la modulation de l'activation par l'isoprotérénol a atteint son maximum pour les deux conditions. Nos résultats montrent également que l'isoprotérénol a augmenté l'amplitude du courant maximum  $I_{Na}$  en augmentant la conductance maximale des canaux sodiques.

Enfin, nos résultats montrent que l'isoprotérénol augmente l'excitabilité cardiaque puisque le seuil d'activation des canaux sodiques est plus proche du potentiel membranaire de repos. Au regard de ces résultats, les rats épileptiques semblent être sous une légère dominance sympathique.

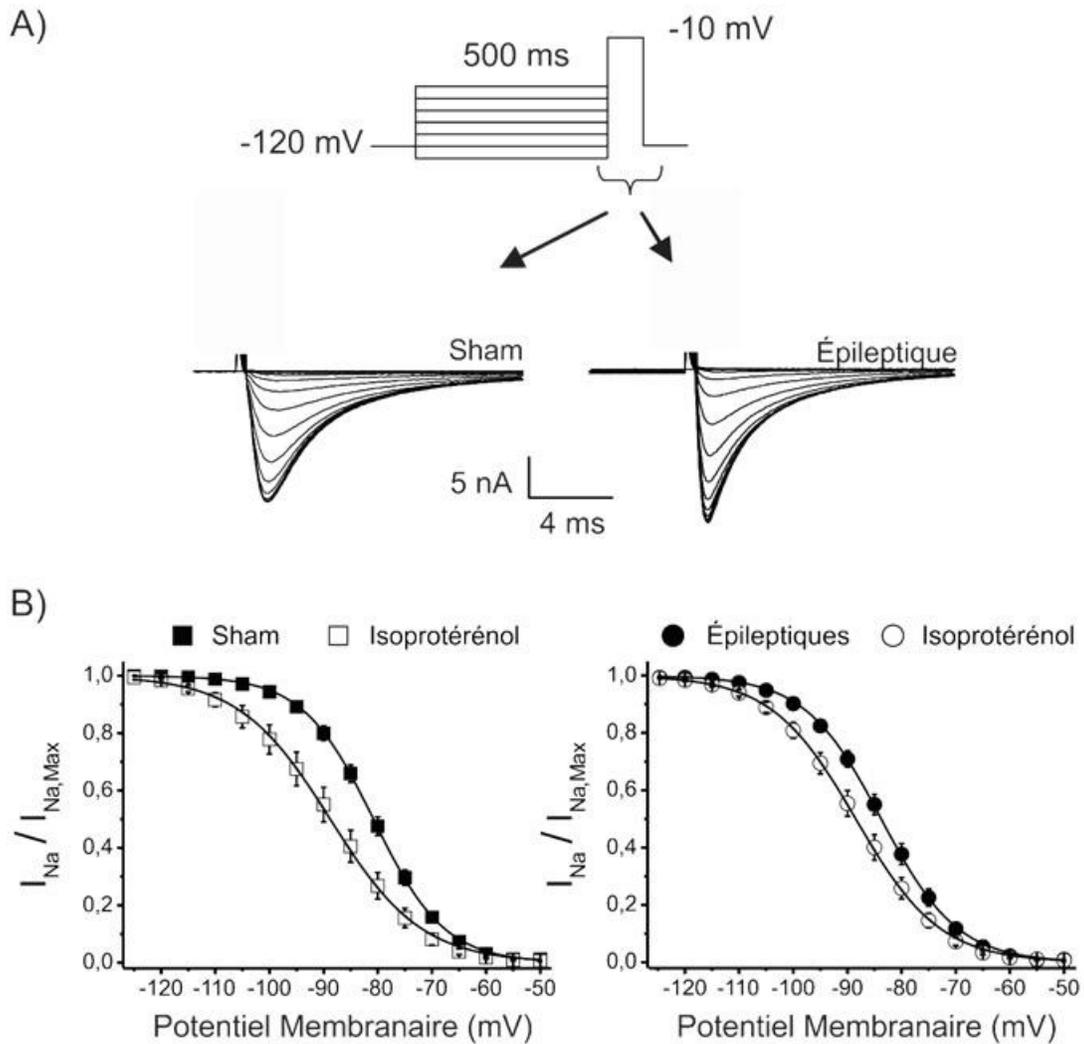


**Figure 3.3.3.1 L'isoprotérénol augmente à la fois la densité de courant et la conductance maximale pour les conditions sham et épileptiques. L'épilepsie réduit l'effet de l'isoprotérénol sur la courbe  $m^\infty$**

**A)** Tracés de courants sham et épileptique contrôlés et après incubation durant 30 minutes avec 10  $\mu\text{M}$  d'isoprotérénol. Les enregistrements d' $I_{\text{Na}}$  ont été obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants de pic ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel. **C)** Densités des courants  $I_{\text{Na}}$  maximums pour les conditions sham et épileptique avec et sans isoprotérénol. L'isoprotérénol double la densité de courant en conditions sham et épileptique. **D)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). **E)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel furent calculées suivant le rapport  $I_{\text{Na}}/(V_m - E_{\text{Na}})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=21 ; +Iso : n= 17 ; Épileptique : n=35 ; +Iso : n=20). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

**3.3.3.2 L'isoprotérénol diminue moins fortement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique**

L'augmentation de courant sodique pic induite par l'isoprotérénol semble être en partie due à une augmentation de la conductance maximale des canaux sodiques, mais elle peut également être due à un changement de la disponibilité des canaux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'isoprotérénol sur la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.3.2A** montre deux tracés de courants représentatifs avec en encart le protocole de stimulation utilisé. La **figure 3.3.3.2B** montre que l'épilepsie a significativement décalé les  $V_{1/2}$  de  $-80.8 \pm 0.1$  mV à  $-88.8 \pm 0.2$  mV et de  $-83.8 \pm 0.1$  mV à  $-88.5 \pm 0.1$  mV ( $p < 0.05$ , F-Test). Comme pour les courbes d'activation, après l'ajout de l'isoprotérénol, les deux courbes de disponibilités ne sont plus différentes, indiquant que la réponse à 10  $\mu\text{M}$  d'isoprotérénol est la même dans les deux conditions. Cependant, l'épilepsie diminue l'effet de l'isoprotérénol sur la disponibilité des canaux sodiques puisque le décalage observé en condition épileptique est moins important que celui des sham. Ces résultats nous indiquent que l'épilepsie augmente le tonus adrénergique (augmentation chronique d'adrénaline circulante) mais n'entraîne pas de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

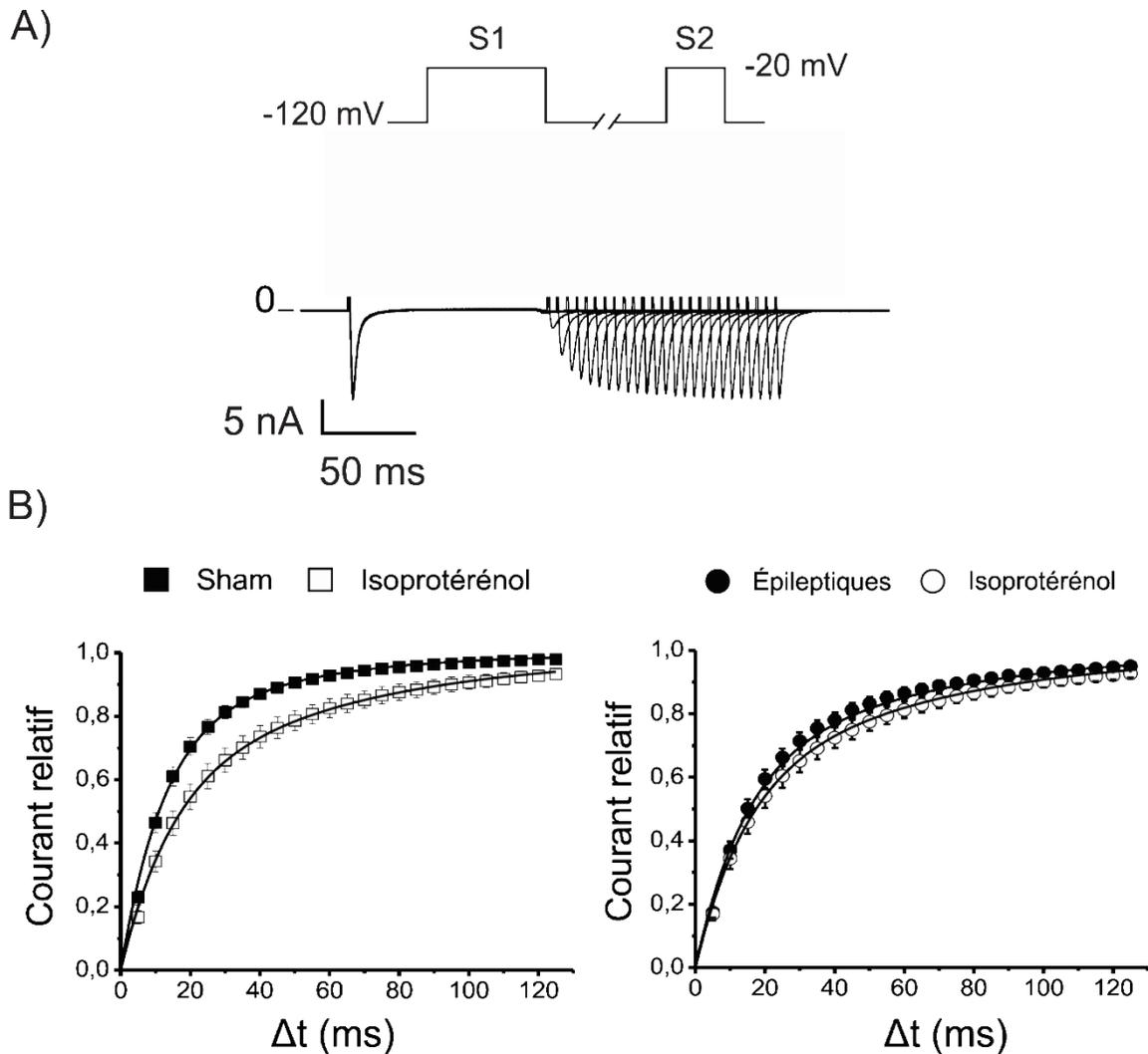


**Figure 3.3.3.2 L'isoprotérénol diminue moins fortement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée pour les conditions sham et épileptique. **B)** Les courbes d'inactivation sham, +isoprotérénol et épileptique, +isoprotérénol ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na} / I_{Na,Max}$ ) et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. L'isoprotérénol a significativement décalé les potentiels de demi-inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés. (Sham : n=21 ; +Iso : n= 16 ; Épileptique : n=17 ; + Iso : n=20).  $P < 0.05$ , F-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.3.3.3 *L'isoprotérénol augmente le temps de réactivation des canaux sodiques uniquement en condition sham*

Nos résultats précédents montraient une augmentation du temps de réactivation des canaux sodiques en condition épileptique et l'impact que cela pouvait avoir sur l'apparition de BAV. Les effets de l'isoprotérénol sur les paramètres d'activation et d'inactivation des canaux sodiques sont réduits en condition épileptique, indiquant que les rats épileptiques semblent être sous dominance sympathique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons également analysé l'effet de l'isoprotérénol sur le temps de réactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.3.3A** montre un tracé de courant représentatif obtenu grâce au protocole de stimulation illustré dans l'encart. La **figure 3.3.3.3B** correspond aux courbes de réactivation en condition sham et épileptique avec et sans isoprotérénol. En condition sham, l'isoprotérénol a augmenté de façon significative les temps de réactivation des canaux sodiques de  $12.17 \pm 0.29$  ms à  $14.08 \pm 0.29$  ms pour la constante de temps rapide  $\tau_r$  et de  $44.22 \pm 1.76$  ms à  $61.87 \pm 0.83$  ms pour la constante de temps lente  $\tau_l$ . En revanche, en condition épileptique, l'isoprotérénol n'a pas modifié les paramètres de réactivation des canaux sodiques puisque les valeurs obtenues ne sont pas statistiquement différentes (**Tableau 4**). Encore une fois, les deux courbes isoprotérénol sont pratiquement identiques, ce qui nous indique que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ne sont pas désensibilisés. En revanche, les animaux épileptiques sont insensibles à l'isoprotérénol, confirmant ainsi la présence d'une dominance sympathique.



**Figure 3.3.3.3 L'isoprotérénol diminue le temps de réactivation des canaux sodiques uniquement en condition sham**

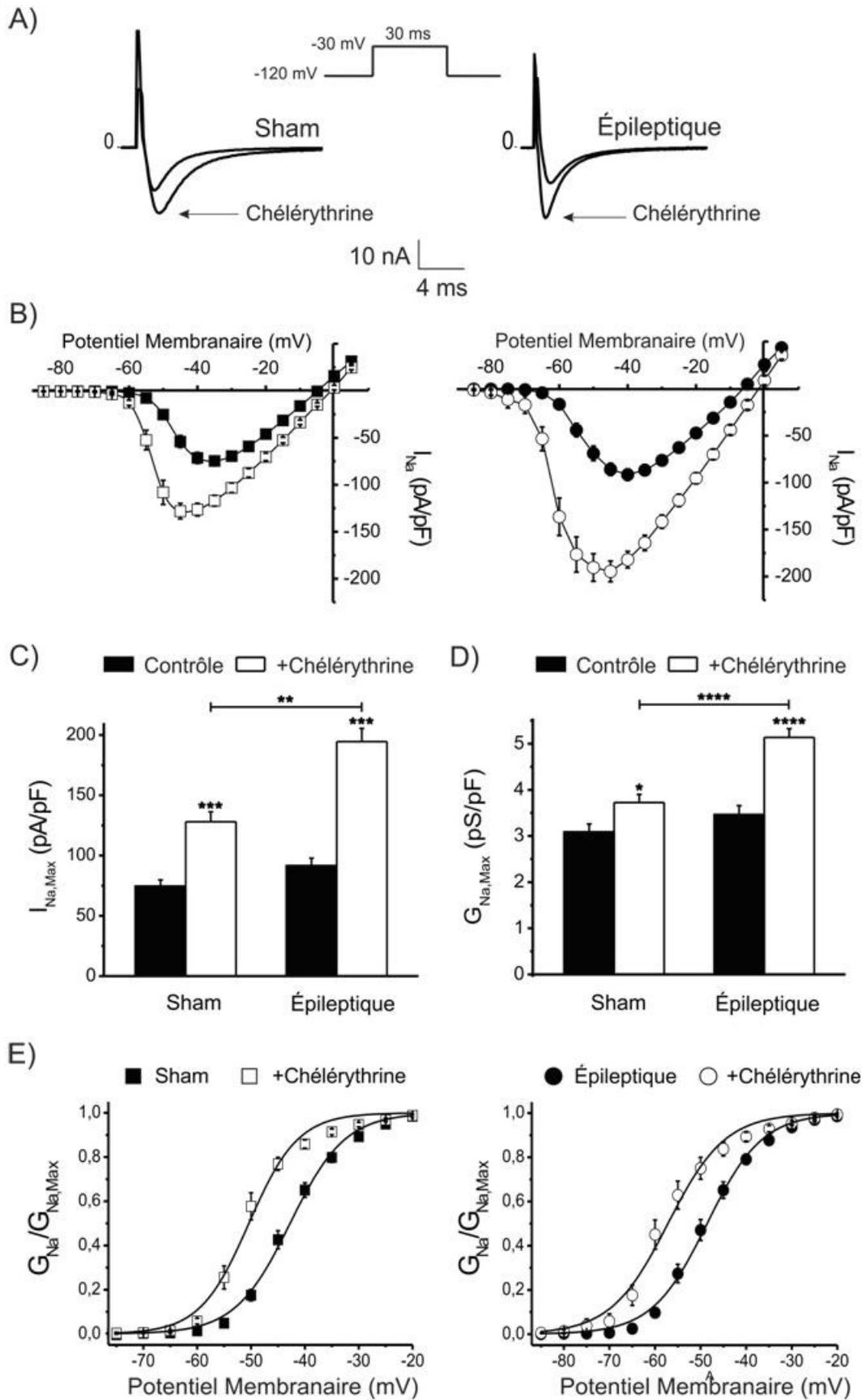
**A)** Protocole standard double pulse (S1-S2) de -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms utilisé afin de mesurer le temps de réactivation des canaux sodiques à partir des états inactivés. **B)** Courbes de réactivation pour les différentes conditions étudiées. Les courbes sont obtenues par le rapport de :  $I_{Na} (S2/S1)$  en fonction de  $\Delta t$  et lissées par une fonction double exponentielle. L'isoprotérénol retarde davantage la réactivation des canaux sodiques en condition sham par rapport aux épileptiques. (Sham :  $n=22$  ; +Iso :  $n=18$  ; Épileptique :  $n=33$  ; + Iso :  $n=22$ ). Valeurs  $\pm$  SEM.

3.3.4 L'épilepsie ne modifie pas l'activité de la PKC sur les paramètres d'activation et de réactivation des canaux sodiques. En revanche, la PKC est impliquée dans la modulation de la disponibilité des canaux sodiques en épilepsie

*3.3.4.1 L'inhibition de la PKC entraîne une augmentation de l'amplitude d' $I_{Na, Max}$ , une augmentation de la conductance maximale ainsi qu'un décalage négatif de la courbe  $m^\infty$  en condition sham et épileptique*

Les précédents résultats suggèrent que les animaux épileptiques sont sous dominance sympathique. L'isoprotérénol augmente à la fois les niveaux de PKA et PKC via la voie de l'adénylate-cyclase (AC). L'AC transforme l'ATP en AMPc qui va à son tour agir sur la PKA. La PKA va alors phosphoryler les canaux calciques de type L ce qui va permettre l'entrée d'ions calcium à l'intérieur de la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre va engendrer l'activation de la PKC. Afin de déterminer si les effets induits par l'isoprotérénol sont dus à un changement dans l'activité de la PKC en condition épileptique, nous avons utilisé la chébérythrine seule dans le but de bloquer la PKC uniquement. La **figure 3.3.4.1A** montre deux tracés de courants représentatifs d' $I_{Na, Max}$  en condition sham et épileptique avec et sans chébérythrine. La **figure 3.3.4.1B** correspondant aux relations courant-potentiel (I/V) obtenues pour les différentes conditions, montre que l'inhibition de la PKC a augmenté l'amplitude du courant maximum d' $I_{Na}$  d'environ 42% et 53% respectivement pour les conditions sham et épileptique. En effet, les valeurs de densités maximales après ajout de chébérythrine sont significativement augmentées et sont de  $-128.1 \pm 8.3$  pA/pF et de  $-194,5 \pm 10.9$  pA/pF (**Figure 3.3.4.1C**,  $p < 0.001$ , T-test). Nos résultats montrent également que la chébérythrine n'a pas eu les mêmes effets sur le seuil d'activation des canaux sodiques et le courant de pic  $I_{Na}$  en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.4.1B** montre que la chébérythrine a décalé le pic d' $I_{Na}$  de -10 mV et -5 mV ainsi que le seuil d'activation des canaux sodiques de -5 mV et -15 mV respectivement pour les conditions sham et épileptique. Cependant, dans les deux conditions, la chébérythrine a décalé le pic d' $I_{Na}$  à une valeur de -45 mV. Ces changements indiquent que la chébérythrine a modifié la dépendance au voltage

des canaux et que son effet est plus important en condition épileptique. La **figure 3.3.4.1C** montre que l'épilepsie amplifie l'effet de la chélérythrine sur  $I_{Na, Max}$  puisque l'augmentation de courant observée en condition épileptique est significativement plus importante que celle observée en condition sham ( $p < 0.01$ , T-test). La **figure 3.3.4.1E** montre que la chélérythrine a significativement augmenté la conductance maximale de  $3.1 \pm 0.2$  pS/pF à  $3.7 \pm 0.2$  pS/pF et de  $3.5 \pm 0.2$  pS/pF à  $5.1 \pm 0.2$  pS/pF respectivement pour les conditions sham et épileptique. De plus, l'augmentation de la conductance maximale par la chélérythrine en condition épileptique est significativement plus importante comparativement aux sham. L'analyse des courbes d'activation d' $I_{Na}$  montre que la chélérythrine a significativement décalé le  $V_{1/2}$  de  $-42.8 \pm 0.3$  mV à  $-50.4 \pm 0.4$  mV et de  $-48.6 \pm 0.3$  mV à  $-57.2 \pm 0.5$  mV respectivement pour les conditions sham et épileptique (**Figure 3.3.4.1D**,  $p < 0.05$ , F-test). Après ajout de  $10 \mu\text{M}$  de chélérythrine, les valeurs des  $V_{1/2}$  sham et épileptique sont significativement différentes ( $p < 0.05$ , F-test), indiquant que l'épilepsie a également amplifié l'effet de la chélérythrine sur les paramètres d'activation des canaux sodiques. Cependant, le décalage des courbes d'activation induit par la chélérythrine est similaire dans les deux conditions et est compris entre  $-7.5$  et  $-8.5$  mV. Ces résultats indiquent que la chélérythrine a modulé les paramètres d'activation des canaux sodiques de la même façon dans les deux groupes. Le décalage d'environ  $6-7$  mV de la courbe  $m_{\infty}$  induit par l'épilepsie est donc à l'origine du décalage observé ici après l'ajout de la chélérythrine. Nos résultats montrent également que la chélérythrine a augmenté l'amplitude du courant maximum  $I_{Na}$  en augmentant la conductance maximale des canaux sodiques. Enfin, nos résultats montrent qu'une inhibition de la PKC a davantage augmenté l'excitabilité cardiaque en condition épileptique puisque le seuil d'activation des canaux sodiques est plus proche du potentiel membranaire de repos comparativement aux rats sham.

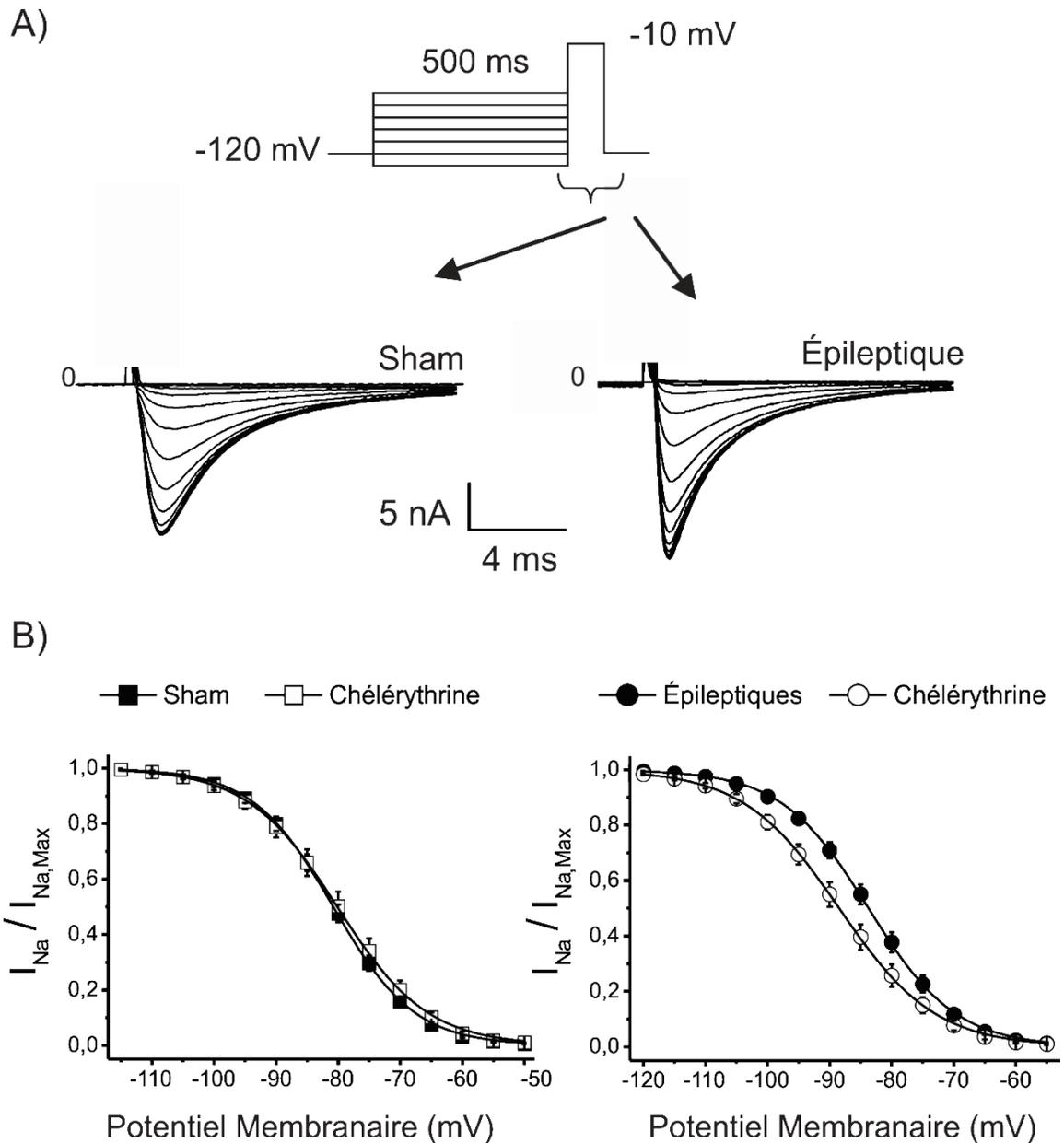


**Figure 3.3.4.1 La chélérythrine double la densité de courant et augmente l'excitabilité en conditions sham et épileptique**

**A)** Tracés de courants sham et épileptique avant et après 10 minutes d'incubation avec 10  $\mu\text{M}$  de chélérythrine. Les enregistrements d' $I_{\text{Na}}$  ont été obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants de pic ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué. **C)** Densités des courants  $I_{\text{Na}}$  maximums pour les conditions sham et épileptique contrôle et avec chélérythrine. La chélérythrine a doublé la densité de courant. **D)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). **E)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{\text{Na}}/(V_m - E_{\text{Na}})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=21 ; +Chélé : n= 11 ; Épileptique : n=35 ; +Chélé : n=26). \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

*3.3.4.2 La chélérythrine diminue uniquement la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique*

Comme pour l'isoprotérénol, l'augmentation de courant induite par la chélérythrine semble être en partie due à une augmentation de la conductance maximale des canaux sodiques, mais elle peut également être due à un changement de la disponibilité des canaux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de la chélérythrine sur la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.4.2A** montre deux tracés de courant représentatifs avec en encart le protocole de stimulation utilisé. La **figure 3.3.4.2B** correspond aux courbes de disponibilité contrôles et traitées avec 10  $\mu\text{M}$  de chélérythrine pour les conditions sham et épileptiques. En condition sham, la chélérythrine n'a pas modifié les valeurs des potentiels de demi-inactivation des canaux sodiques qui sont de  $-80.8 \pm 0.1$  mV et de  $-80.2 \pm 0.1$  mV respectivement pour les conditions contrôle et avec chélérythrine. En revanche, la chélérythrine a significativement diminué la disponibilité en condition épileptique et décalé le  $V_{1/2}$  de  $-83.8 \pm 0.1$  mV à  $-88.5 \pm 0.1$  mV. ( $p < 0.05$ , F-test). Le décalage induit par la chélérythrine sur le potentiel de demi-inactivation est similaire à celui observé précédemment après l'ajout de l'isoprotérénol. Ces résultats indiquent que contrairement aux sham, la PKC module la disponibilité des canaux sodiques en condition épileptique.

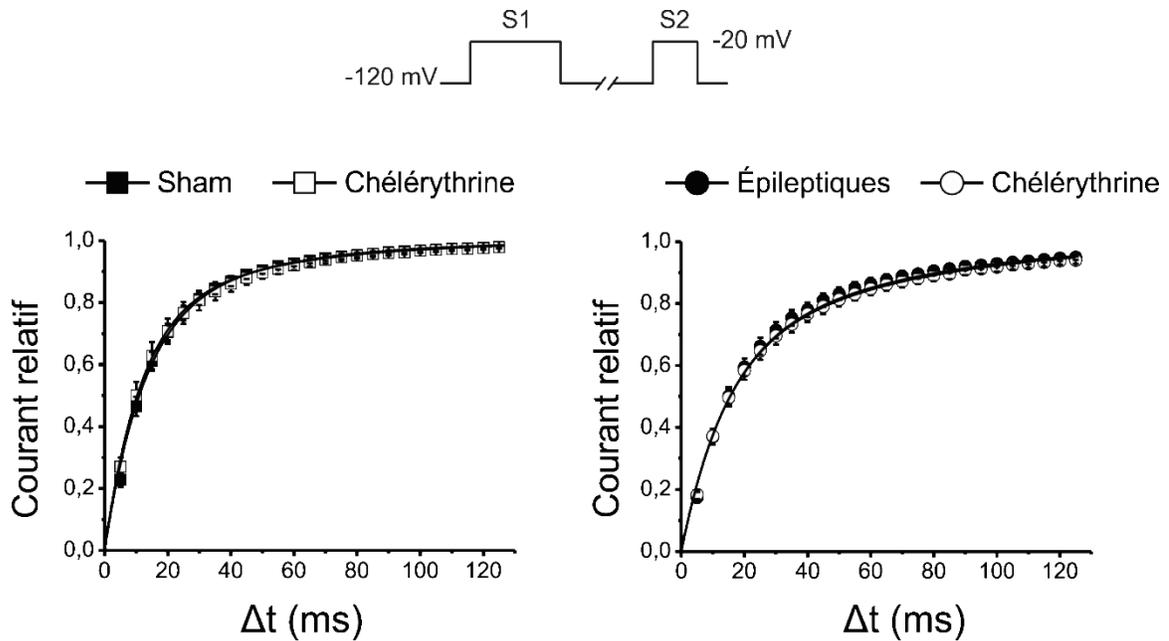


**Figure 3.3.4.2 La chélérythrine diminue la disponibilité des canaux sodiques uniquement en condition épileptique**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée pour les conditions sham et épileptique. **B)** Les courbes d'inactivation ont été obtenues selon le rapport  $(I_{Na}/I_{Na,Max})$  et lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=21 ; +Chélé : n= 12 ; Épileptique : n=17 ; +Chélé : n=27). Épileptiques :  $P < 0.05$ , F-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.3.4.3 *L'inhibition de la PKC ne module pas le temps de réactivation des canaux sodiques*

Nos résultats précédents montraient que l'isoprotérénol a augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques seulement en condition sham. Afin de vérifier si cette diminution était due à la PKC, nous avons analysé l'effet la chélerythrine sur le temps de réactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.4.3** correspond aux courbes de réactivation en condition sham et épileptique avec et sans chélerythrine. Nos résultats montrent que dans les deux conditions, les courbes sham et chélerythrine sont superposées. En condition sham, les valeurs de constantes de temps rapides  $\tau_r$  sont de  $12.17 \pm 0.29$  ms et de  $11.23 \pm 0.45$  ms et les valeurs des constantes de temps lentes  $\tau_l$  sont de  $44.22 \pm 1.76$  ms et de  $46.2 \pm 1.02$  ms. En condition épileptique, les valeurs de constantes de temps rapides  $\tau_r$  sont de  $13.64 \pm 0.39$  ms et de  $13.45 \pm 0.27$  ms et les valeurs des constantes de temps lentes  $\tau_l$  sont de  $57.99 \pm 1.28$  ms et de  $60.38 \pm 0.98$  ms. Ces résultats nous indiquent que la phosphorylation des canaux via la PKC ne module pas le temps de réactivation des canaux sodiques, et ce pour les deux conditions.



**Figure 3.3.4.3 L'inhibition de la PKC n'entraîne pas de modification du temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique**

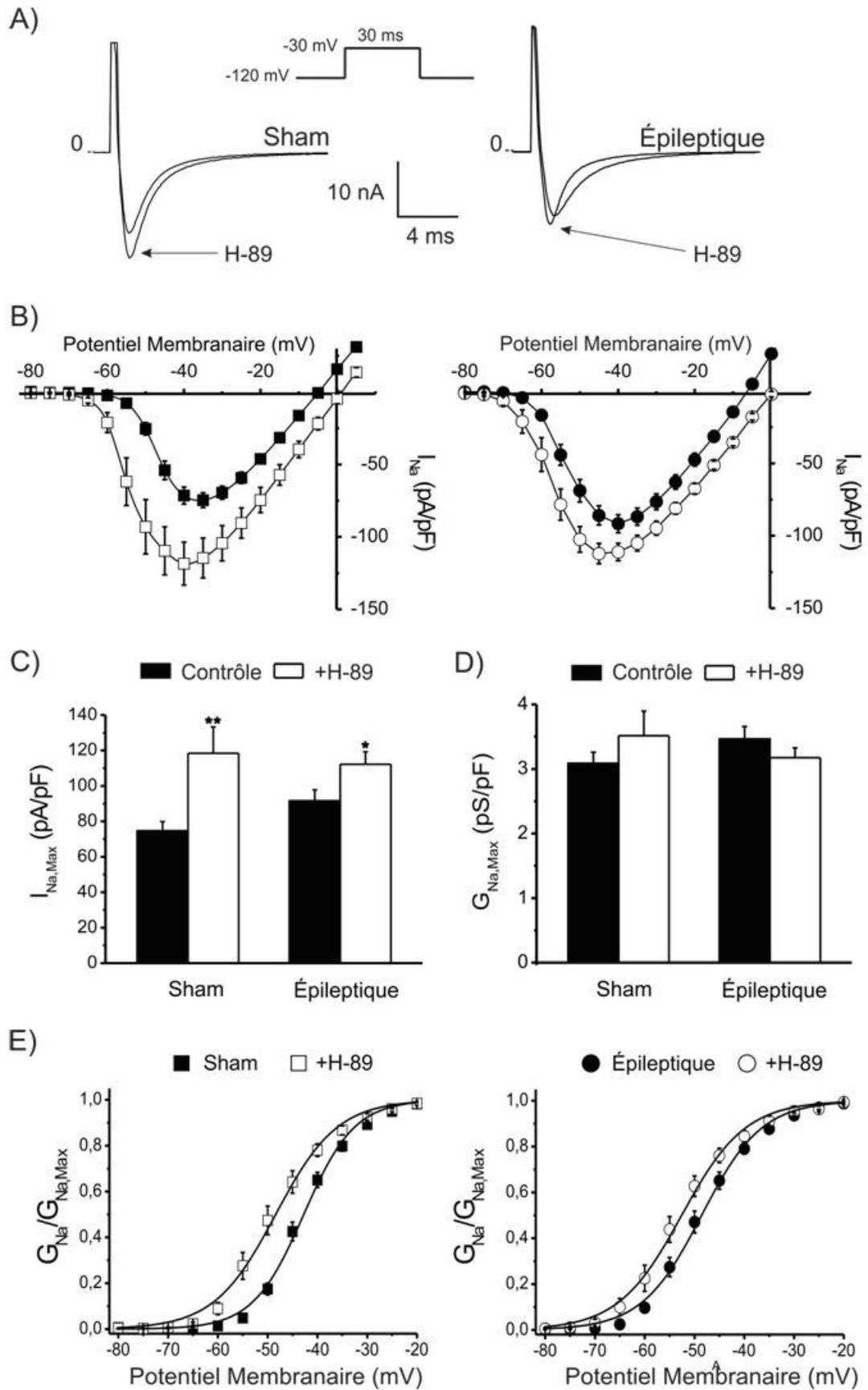
Protocole standard double pulse (S1-S2) de -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms utilisé afin de mesurer le temps de réactivation des canaux sodiques à partir des états inactivés. Les courbes de réactivation pour les différentes conditions étudiées ont été obtenues selon le rapport :  $I_{Na} (S2/S1)$  en fonction de  $\Delta t$  et lissées par une fonction double exponentielle. L'inhibition de la PKC ne modifie pas le temps de réactivation des canaux sodiques en condition sham ou épileptique. (Sham : n=22 ; + Chélé : n= 12 ; Épileptique : n=33 ; + Chélé : n=27). Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.3.5 L'épilepsie semble diminuer l'activité de la PKA

#### 3.3.5.1 L'inhibition de la PKA entraîne une légère augmentation de l'amplitude d' $I_{Na, Max}$ ainsi qu'un décalage négatif de la courbe $m^\infty$ en condition sham et épileptique

Après avoir déterminé les effets de la PKC sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques, nous avons utilisé l'inhibiteur H-89 seul afin de bloquer la PKA. La **figure 3.3.5.1A** montre deux tracés de courants représentatifs d' $I_{Na, Max}$  en condition sham et épileptique avec et sans H-89. La **figure 3.3.5.1B** correspondant aux relations courant-potentiel ( $I/V$ ) obtenues pour les différentes conditions, montre que l'inhibition de la PKA a augmenté l'amplitude du courant maximum d' $I_{Na}$  d'environ 37% et 18% respectivement pour les conditions sham et épileptique.

En effet, les valeurs de densités maximales après ajout de H-89 sont significativement augmentées et sont de  $-118.5 \pm 14.9$  pA/pF et de  $-112.3 \pm 7.1$  pA/pF (**Figure 3.3.5.1C**,  $p < 0.01$  et  $p < 0.05$ , T-test). La **figure 3.3.5.1B** montre que le H-89 a décalé le pic d' $I_{Na}$  de  $-5$  mV pour les conditions sham et épileptique. Nos résultats montrent également que le H-89 n'a pas eu les mêmes effets sur le seuil d'activation des canaux sodiques. La **figure 3.3.5.1B** montre que le H-89 a décalé le seuil d'activation des canaux sodiques de  $-10$  et  $-5$  mV respectivement pour les conditions sham et épileptique. Cependant, dans les deux conditions, le H-89 a décalé le pic d' $I_{Na}$  à une valeur de  $-45$  mV. De plus,  $I_{Na, Max}$  n'est pas significativement différent entre les deux groupes après l'ajout de H-89. La **figure 3.3.5.1D** montre que le H-89 n'a pas modifié la conductance maximale des canaux sodiques (**Tableau 4**). L'analyse des courbes d'activation d' $I_{Na}$  montre que le H-89 a significativement décalé le  $V_{1/2}$  de  $-42.8 \pm 0.3$  mV à  $-48.4 \pm 0.3$  mV et de  $-48.6 \pm 0.3$  mV à  $-52.6 \pm 0.3$  mV respectivement pour les conditions sham et épileptique (**Figure 3.3.5.1E**,  $p < 0.05$ , F-test). Ces changements indiquent que le H-89 a modifié la dépendance au voltage des canaux sodiques. Le décalage de la courbe  $m_{\infty}$  induit par le H-89 est moins important en condition épileptique qu'en condition sham. En revanche, dans les deux conditions (**Figure 3.3.5.1B**), le potentiel d'inversion est décalé vers des potentiels plus positifs. Ce décalage peut donc être à l'origine de l'augmentation d' $I_{Na}$ . Ce point sera plus élaboré dans la section discussion.

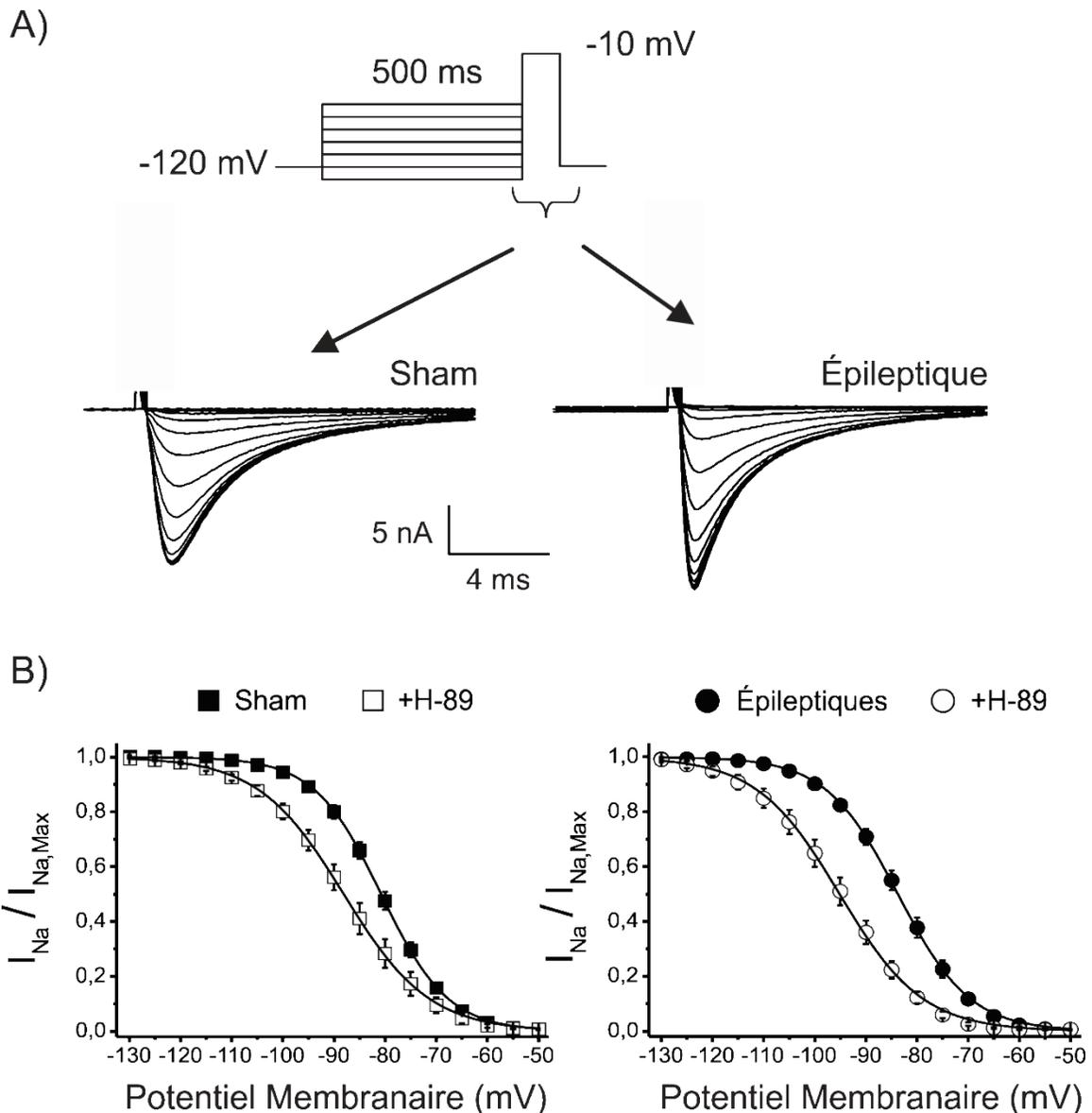


### **Figure 3.3.5.1 L'inhibition de la PKA augmente l'amplitude du courant sodique et l'excitabilité**

**A)** Tracés de courants sham et épileptique avant et après incubation durant 10 minutes avec 10  $\mu$ M de H-89. Les enregistrements d' $I_{Na}$  ont été obtenus suite à une stimulation à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 mV à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants de pic ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué. **C)** Densités des courants  $I_{Na}$  maximums pour les conditions sham et épileptique contrôle et avec H-89. **D)** Histogramme des conductances maximales déterminées par la valeur de la pente de la partie linéaire de la courbe IV (pA/pF). **E)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel furent calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. (Sham : n=21 ; +H-89 : n= 14 ; Épileptique : n=35 ; +H-89 : n=16). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### *3.3.5.2 Le H-89 diminue la disponibilité des canaux sodiques en condition sham et épileptique*

L'augmentation du courant  $I_{Na, Max}$  peut avoir pour origine une modification de la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet du H-89 sur la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.5.2A** montre deux tracés de courant représentatifs avec en encart le protocole de stimulation utilisé. La **figure 3.3.5.2B** correspond aux courbes de disponibilité. Nos résultats montrent que le H-89 a significativement décalé le potentiel de demi-inactivation de  $-80.8 \pm 0.1$  mV à  $-88.1 \pm 0.1$  mV et de  $-83.8 \pm 0.1$  mV et de  $-95.21 \pm 0.2$  mV respectivement pour les conditions sham et épileptique ( $p < 0.05$ , F-test). Malgré le décalage induit par l'épilepsie, le H-89 décale davantage le  $V_{1/2}$  d'inactivation en condition épileptique comparativement aux sham, ce qui nous indique que l'épilepsie modifie la régulation de l'inactivation des canaux sodiques par la PKA.

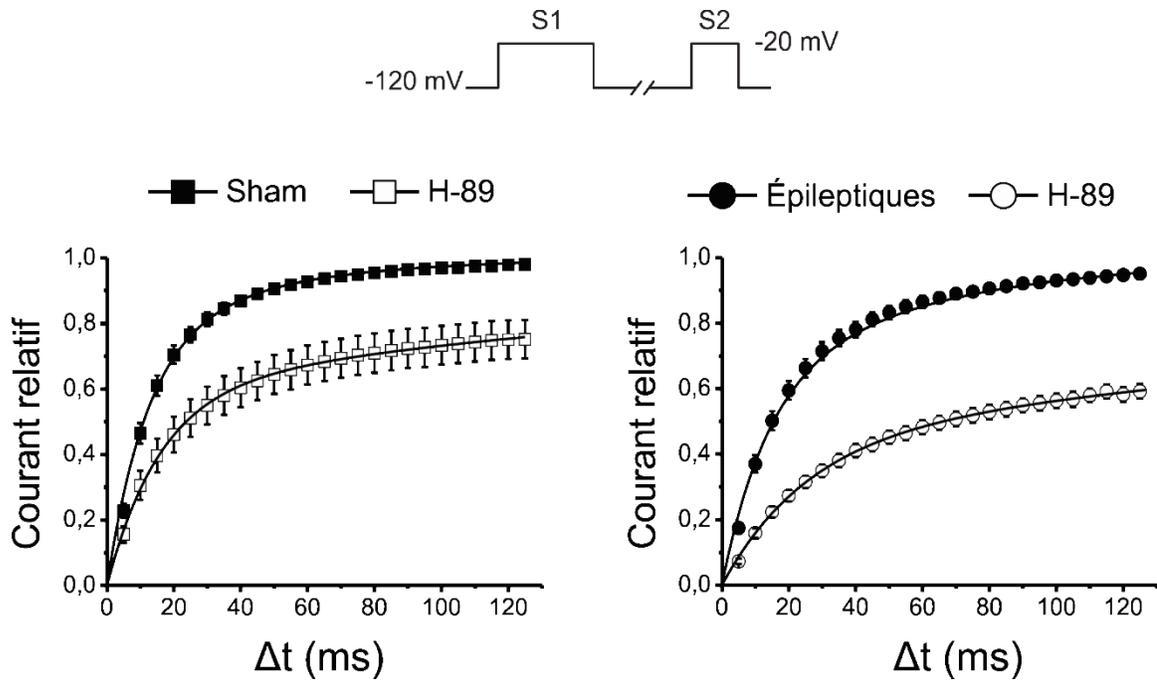


**Figure 3.3.5.2 L'inhibition de la PKA diminue la disponibilité des canaux sodiques en condition sham et épileptique**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée pour les conditions sham et épileptique. **B)** Les courbes d'inactivation sham avec ou sans H-89 et épileptique avec ou sans H-89 furent obtenues selon le rapport  $(I_{Na}/I_{Na,Max})$ . Les courbes ont été lissées selon la formule de Boltzmann:  $I_{Na}/I_{Na,Max} = (1/1+e^{(V-V_{1/2})/k})$ . L'application de 10  $\mu$ M de H-89 décale significativement les potentiels de demi-inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés ( $p < 0.05$ , F-test). L'épilepsie amplifie l'effet de H-89 sur la disponibilité des canaux sodiques. (Sham:  $n=21$ ; +H-89:  $n=14$ ; Épileptique:  $n=17$ ; +H-89:  $n=16$ ).  $P < 0.05$ , F-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.3.5.3 *L'inhibition de la PKA augmente le temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique*

Nos résultats précédents montraient que l'isoprotérénol a augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques en condition sham seulement. L'inhibition de la PKC montre que la réactivation des canaux sodiques n'est pas dépendante de celle-ci. Afin de vérifier si cette augmentation est finalement due à une modulation du temps de réactivation des canaux sodiques par la PKA, nous avons analysé l'effet du H-89 sur le temps de réactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique. La **figure 3.3.5.3** correspond aux courbes de réactivation en condition sham et épileptique avec et sans H-89. Nos résultats montrent que dans les deux conditions, l'inhibition de la PKA a significativement augmenté le temps de réactivation. En condition sham, le H-89 a augmenté les temps de réactivation des canaux sodiques de  $12.17 \pm 0.29$  ms à  $16.01 \pm 0.16$  ms pour la constante de temps rapide  $\tau_r$  et de  $44.22 \pm 1.76$  ms à  $247.79 \pm 3.32$  ms pour la constante de temps lente  $\tau_l$ . L'augmentation du temps de réactivation par le H-89 est encore plus marquée en condition épileptique. En effet, le H-89 a augmenté le temps de réactivation de  $13.64 \pm 0.39$  ms à  $25.62 \pm 0.25$  ms pour la constante de temps rapide  $\tau_r$  et de  $57.99 \pm 1.28$  ms à  $400.29 \pm 5.08$  ms pour la constante de temps lente  $\tau_l$ . Ces résultats nous indiquent que la phosphorylation des canaux via la PKA module fortement le temps de réactivation des canaux sodiques, et ce pour les deux conditions. La plus forte augmentation du temps de réactivation observée en condition épileptique nous indique que l'épilepsie modifie la régulation du temps de réactivation des canaux sodiques par la PKA. L'augmentation importante du temps de réactivation des canaux sodiques en condition épileptique suite à l'inhibition de la PKA concordent avec les hypothèses concernant de probables modifications du tonus adrénergique, le développement de bradycardie et l'apparition de bloc de conduction observé chez les patients épileptiques.



**Figure 3.3.5.3 L'inhibition de la PKA retarde la réactivation des canaux sodiques en condition sham et épileptique**

Protocole standard double pulse (S1-S2) de -20 mV avec un intervalle de temps ( $\Delta t$ ) croissant de 5 ms utilisé afin de mesurer le temps de réactivation des canaux sodiques à partir des états inactivés. Les courbes de réactivation pour les différentes conditions étudiées ont été obtenues selon le rapport :  $I_{Na} (S2/S1)$  en fonction de  $\Delta t$  et lissées par une fonction double exponentielle. L'inhibition de la PKA retarde le temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épileptique. (Sham :  $n=22$  ; + H-89 :  $n= 14$  ; Épileptique :  $n=33$  ; + H-89 :  $n=17$ ). Valeurs  $\pm$  SEM.

	Sham				Épilepsie			
	Contrôle	Isoprotérénol	Chélérythrine	H-89	Contrôle	Isoprotérénol	Chélérythrine	H-89
$I_{Na}$ , pA/pF	$-74.7 \pm 5.1$	$-149.2 \pm 9.7^{+++}$	$-128.1 \pm 8.3^{+++}$	$-118.5 \pm 14.9^{++}$	$-91.6 \pm 6.2^*$	$-191.6 \pm 20.5^* \quad +++$	$-194.5 \pm 10.9^{**} \quad +++$	$-112.3 \pm 7.1^\dagger$
$G_{Na, Max}$ , pS/pF	$3.1 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.2^{+++}$	$3.7 \pm 0.2^\dagger$	$3.5 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.2$	$5.5 \pm 0.3^{**} \quad +++$	$5.1 \pm 0.2^{****} \quad +++$	$3.2 \pm 0.2$
<b>Activation</b>								
$V_{1/2}$ , mV	$-42.8 \pm 0.3$	$-55.4 \pm 0.3^\dagger$	$-50.4 \pm 0.4^\dagger$	$-48.4 \pm 0.3^\dagger$	$-48.6 \pm 0.3^*$	$-56.6 \pm 0.3^\dagger$	$-57.2 \pm 0.5^\dagger$	$-52.6 \pm 0.3^\dagger$
k, mV	$5.1 \pm 0.2$	$5.9 \pm 0.2$	$4.5 \pm 0.3$	$6.2 \pm 0.3$	$6.1 \pm 0.2$	$5.8 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.4$	$6.4 \pm 0.3$
<b>Inactivation</b>								
$V_{1/2}$ , mV	$-80.8 \pm 0.1$	$-88.8 \pm 0.2^\dagger$	$-80.2 \pm 0.1$	$-88.1 \pm 0.1^\dagger$	$-83.8 \pm 0.1^*$	$-88.5 \pm 0.1^\dagger$	$-88.5 \pm 0.1^\dagger$	$-95.1 \pm 0.2^\dagger$
k, mV	$6.2 \pm 0.2$	$8.4 \pm 0.1$	$7.3 \pm 0.1$	$8.3 \pm 0.1$	$7.1 \pm 0.1$	$7.8 \pm 0.1$	$7.7 \pm 0.1$	$8.1 \pm 0.1$
<b>Réactivation</b>								
$A_r$	$0.75 \pm 0.2$	$0.55 \pm 0.2$	$0.75 \pm 0.1$	$0.60 \pm 0.3$	$0.60 \pm 0.2$	$0.55 \pm 0.3$	$0.60 \pm 0.1$	$0.45 \pm 0.2$
$\tau_r$ , ms	$12.17 \pm 0.29$	$14.08 \pm 0.29^\dagger$	$11.23 \pm 0.15$	$16.01 \pm 0.16^{++}$	$13.64 \pm 0.39$	$14.01 \pm 0.24$	$13.45 \pm 0.27$	$25.62 \pm 0.25^{+++}$
$A_i$	$0.25 \pm 0.2$	$0.45 \pm 0.3$	$0.25 \pm 0.1$	$0.40 \pm 0.1$	$0.40 \pm 0.2$	$0.45 \pm 0.1$	$0.40 \pm 0.3$	$0.55 \pm 0.2$
$\tau_i$ , ms	$44.2 \pm 1.76$	$61.87 \pm 0.83^{++}$	$46.2 \pm 1.02$	$247.79 \pm 3.32^{+++}$	$57.99 \pm 1.28$	$63.05 \pm 0.74$	$60.38 \pm 0.98$	$400.29 \pm 5.08^{+++}$

**Tableau 4 Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions sham et épileptique.**

$I_{Na}$  correspond au courant sodique ;  $G_{Na, Max}$  à la conductance maximum ;  $V_{1/2}$  au potentiel de demi-(in)activation ;  $k$  au facteur de pente de l'(in)activation ;  $\tau_r$  et  $\tau_l$  aux constantes de temps rapide et lente de la réactivation;  $A_r$  et  $A_l$  correspondent respectivement aux amplitudes rapide et lente associées aux constantes de temps. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$ , épileptique vs sham, T-test et F-test. † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$  et †††† $P < 0.0001$ , traités (Iso, Chélé et H-89) vs contrôles, T-test et F-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

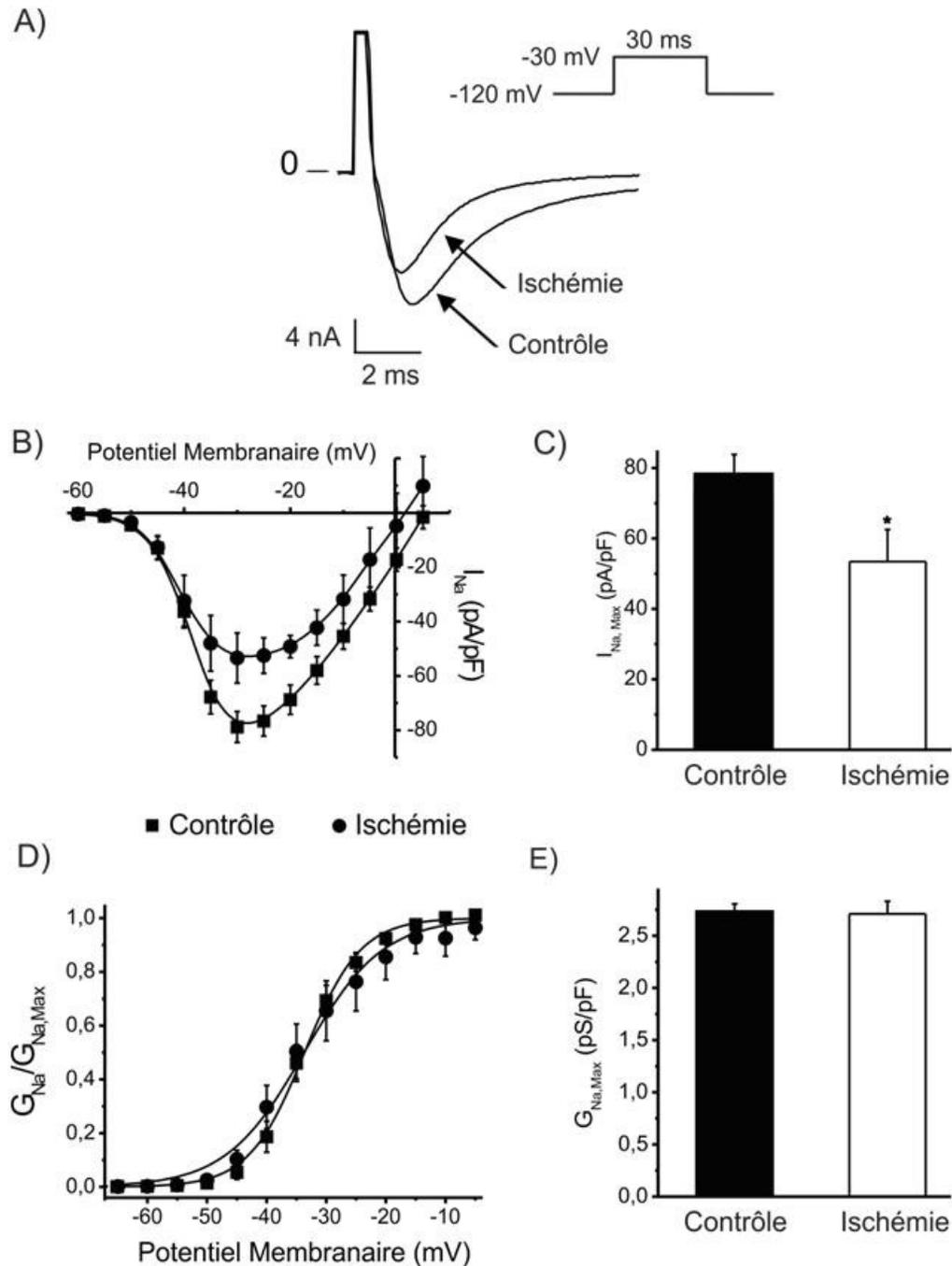
*En résumé, nous avons analysé dans cette étude l'impact de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques ainsi que la participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{NaL}$ . Nous avons analysé les effets de l'épilepsie sur la modulation des canaux par les différentes protéines kinases (A et C). Nos résultats montrent que l'épilepsie augmente l'excitabilité, l'amplitude du courant  $I_{Na, Max}$ , diminue la disponibilité et augmente le temps de réactivation des canaux sodiques. Nos résultats montrent également que l'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  en augmentant le pourcentage de participation des nNavs. L'épilepsie semble aussi induire un état de dominance sympathique sans pour cela désensibiliser les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (l'amplitude d' $I_{Na}$  est doublée dans les deux conditions). Hormis une modulation de la disponibilité en condition épileptique, l'activité de la PKC ne semble pas être modifiée chez les animaux épileptiques. En revanche, nos résultats montrent que l'épilepsie semble diminuer de façon constitutive l'activité de la PKA. Par ailleurs, la PKA semble fortement impliquée dans la régulation de la réactivation des canaux sodiques, que ce soit en condition sham ou épileptique. Ces changements peuvent être à l'origine des arythmies cardiaques présentes chez les personnes épileptiques et expliquer en partie la survenue de problèmes de repolarisation (augmentation d' $I_{NaL}$ , QT long) et de conduction tels que les BAV (diminution de la disponibilité et du temps de réactivation).*

### 3.4 L'ischémie diminue l'amplitude maximale du courant $I_{Na}$ mais augmente $I_{NaL}$ . Les canaux sodiques de type neuronaux contribuent de façon significative à la repolarisation en condition ischémique

L'ischémie est responsable d'une altération de la transmission de l'influx électrique cardiaque. Le courant sodique  $I_{Na}$  joue un rôle capital dans la génération et la propagation de cet influx. Afin de déterminer la cause de ces troubles de conduction, nous avons étudié les paramètres biophysiques d' $I_{Na}$  et  $I_{NaL}$  en condition contrôle et ischémique sur des cardiomyocytes de chiens.

#### 3.4.1 L'ischémie diminue la densité et le courant de pic $I_{Na}$ sans modifier l'activation des canaux sodiques

Tout d'abord, nous avons voulu déterminer l'effet de l'ischémie sur les paramètres d'activation des canaux sodiques et sur l'amplitude maximale d' $I_{Na}$ . La **figure 3.4.1A** montre deux tracés de courants représentatifs en condition contrôle et ischémique. La **figure 3.4.1B** correspondant aux relations courant-potential obtenues pour les différentes conditions, montre que l'ischémie a significativement diminué l'amplitude du courant d' $I_{Na, Max}$  de 32% sans modifier le seuil d'activation des canaux ni le courant  $I_{Na}$  pic. En effet, la **figure 3.4.1C** montre que l'ischémie a diminué l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  de  $-78.8 \pm 5.7$  pA/pF à  $-53.4 \pm 9.2$  pA/pF ( $p < 0.05$ , T-test). Cependant, l'ischémie n'a pas modifié les paramètres d'activation des canaux sodiques comme le montre la **figure 3.4.1D**, où les courbes contrôle et ischémique se superposent (**Tableau 5**). La conductance maximale pouvant modifier l'amplitude du courant nous avons voulu observer l'état de ce paramètre. La **figure 3.4.1E** montre que l'ischémie n'a pas modifié la conductance maximale (**Tableau 5**). Ces résultats indiquent que la diminution du courant sodique en condition ischémique n'est pas reliée à un décalage négatif de la courbe d'activation ou à une diminution de la conductance maximale.



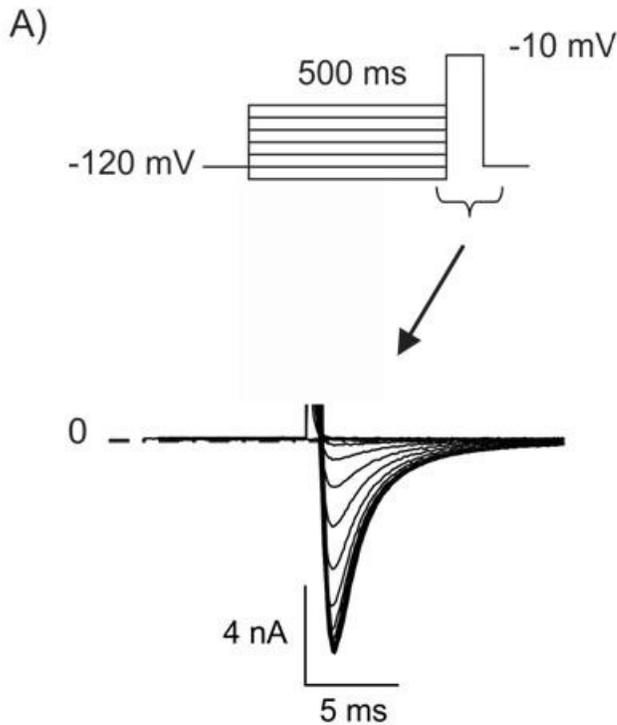
**Figure 3.4.1 L'ischémie diminue l'amplitude maximale du courant sodique chez le chien**

**A)** Tracés de courants contrôles et ischémiques obtenus suite à une stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (encart). Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 mV à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage ( $I/V$ ) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants enregistrés ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué

pour les conditions contrôle et ischémique. **C)** Histogramme des amplitudes maximums d' $I_{Na}$ . **D)** Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. L'ischémie ne modifie pas l'activation des canaux sodiques. **E)** Histogramme des conductances maximales pour les conditions contrôle et ischémique. (Contrôle : n=23 ; ischémie : n=7). \*  $p < 0.05$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

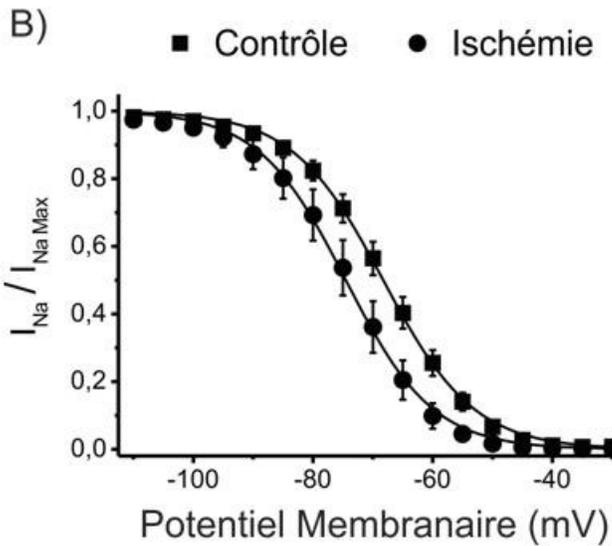
### 3.4.2 L'ischémie diminue la disponibilité des canaux sodiques

Afin de déterminer si la diminution du courant  $I_{Na}$  en condition ischémique n'était pas due à une diminution de la disponibilité des canaux sodiques, nous avons analysé la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques en conditions contrôle et ischémie. La **figure 3.4.2A** montre le protocole de stimulation utilisé ainsi qu'un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. Les courbes d'inactivation contrôle et ischémique ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann (**Figure 3.4.2B**). L'ischémie a significativement décalé le potentiel de demi-inactivation de  $-68.3 \pm 0.2$  mV à  $-74.5 \pm 0.2$  mV respectivement pour les conditions contrôle et ischémique ( $p < 0.05$ , F-test). La disponibilité des canaux sodiques est donc réduite pour des potentiels plus dépolarisés en condition ischémique. Toutefois, le potentiel de maintien utilisé dans le protocole de la **figure 3.4.1** était de  $-120$  mV. Nos résultats montrent qu'à cette valeur de potentiel, la disponibilité est de 100% dans les deux conditions. En revanche, en condition physiologique où le potentiel membranaire de repos est aux alentours de  $-80$  mV, nos résultats montrent que l'ischémie a diminué la disponibilité des canaux sodiques, ce qui peut expliquer la diminution de l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  observé dans la **figure 3.4.1B**. Cependant, la diminution du courant en condition ischémique peut également provenir d'une diminution d'expression des canaux sodiques.



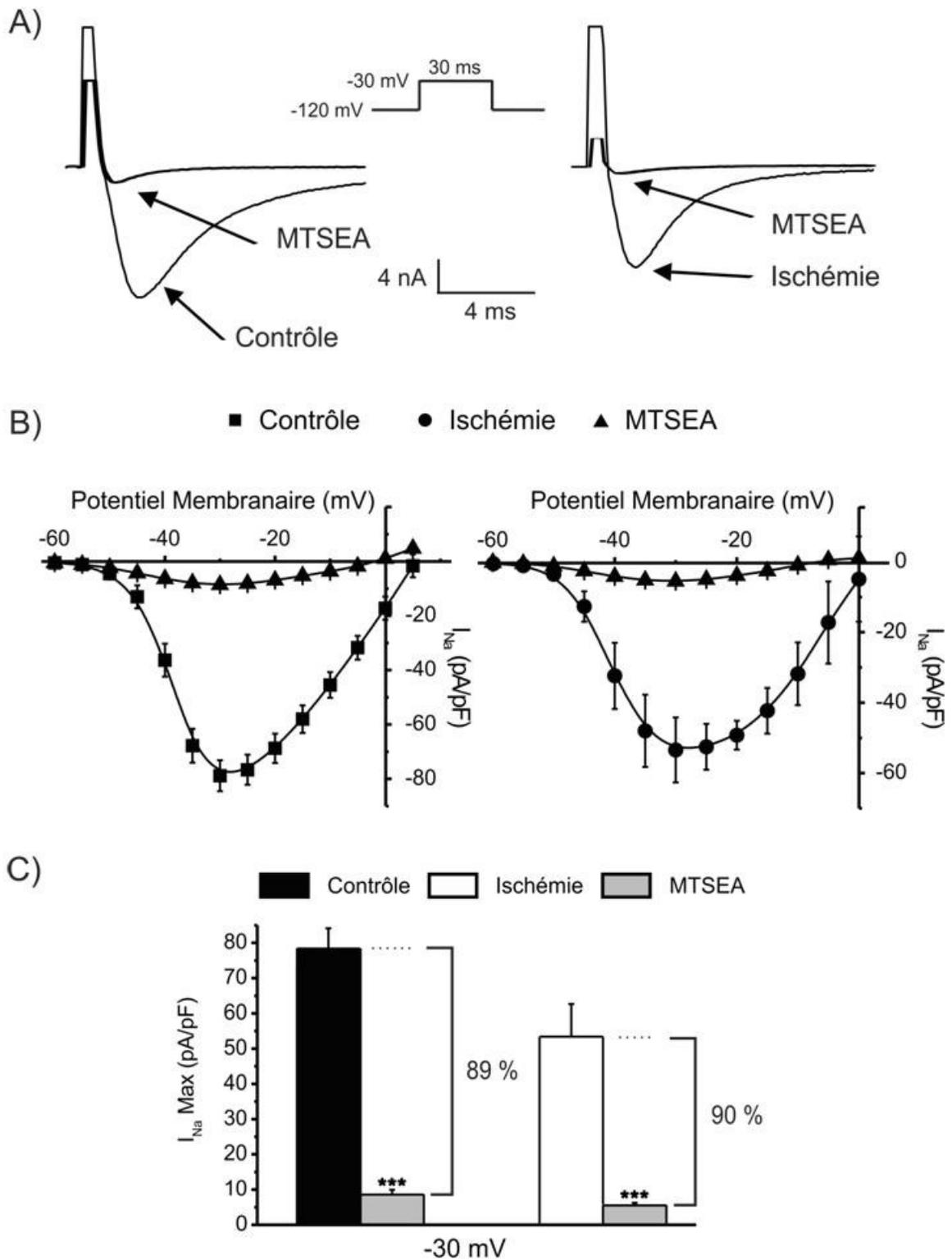
**Figure 3.4.2 L'ischémie diminue la disponibilité des canaux sodiques chez le chien**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation contrôle et ischémique ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{NaMax}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann. (Contrôle :  $n=20$ ; Ischémie :  $n=8$ ). ( $p<0.05$ , F-test). Valeurs  $\pm$  SEM.



### 3.4.3 Le MTSEA bloque la même fraction du courant de pic en condition contrôle et ischémique

La diminution du courant de pic que l'on observe peut avoir pour origine une modification du profil d'expression des différents types de canaux sodiques. Les canaux sodiques de type neuronaux (nNaVs) ont la particularité d'être exprimés au niveau des disques intercalaires, une structure privilégiée dans la transmission de l'influx électrique entre les cardiomyocytes. De plus, les nNaVs présentent une amplitude  $I_{Na, Max}$  plus faible que le type cardiaque. Afin de discriminer la participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{Na, Max}$ , nous avons appliqué 2 mM de MTSEA (Méthane-Thio-Sulfonate-Éthyl-Amine) qui est un bloqueur spécifique de NaV1.5, sur des cardiomyocytes en conditions contrôle et ischémique. Le MTSEA agit directement à l'intérieur du pore du canal et l'obstrue en formant une liaison covalente (pont disulfure) avec la Cystéine 372 présente uniquement dans NaV1.5. La **figure 3.4.3A** montre deux tracés de courants représentatifs en conditions contrôle et ischémie, avant et après perfusion de 2 mM de MTSEA. La **figure 3.4.3B** montre que le MTSEA a très fortement diminué le courant  $I_{Na, Max}$ . En effet, le courant  $I_{Na, Max}$  a diminué de  $-78.8 \pm 5.7$  pA/pF à  $-8,6 \pm 1,4$  pA/pF et de  $-53.4 \pm 9.2$  pA/pF à  $-5,5 \pm 0,7$  pA/pF respectivement pour les conditions contrôle et ischémique. L'inhibition du courant sodique maximum par le MTSEA est similaire dans les deux conditions puisque le MTSEA bloque 89% et 90% respectivement pour les conditions contrôle et ischémie (**Figure 3.4.3C**). Par conséquent, les canaux de type neuronaux (MTSEA insensibles) participent à hauteur de 10% au courant  $I_{Na, Max}$ . Le taux de participation des différents types de canaux sodiques n'est donc pas modifié en condition ischémique.



**Figure 3.4.3 L'ischémie ne modifie pas le pourcentage de participation des canaux sodiques de type non cardiaque au courant  $I_{Na, Max}$**

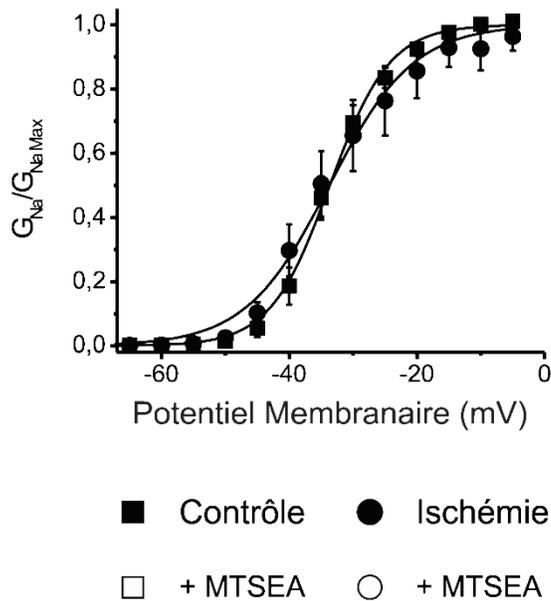
**A)** Tracés de courants contrôle et ischémique avant et après application de 2 mM de MTSEA (bloqueur de NaV1.5). Les courants représentés ont été obtenus suite à une

stimulation de 30 ms à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Le protocole au complet est composé d'une série de stimulations allant de -90 à +40 mV par incréments de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. **B)** Relations courant-voltage (I/V) exprimées en densité de courant (pA/pF). Les courants pics enregistrés ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué. **C)** Histogramme d'amplitudes maximales des courants exprimées en pA/pF pour les conditions contrôle et ischémique avant et après application de 2 mM de MTSEA. Le MTSEA bloque respectivement  $89.1 \pm 1.9 \%$  et  $89.6 \pm 1.3 \%$  du courant  $I_{Na, Max}$  total en conditions contrôle et ischémique. (Contrôle : n=23, +MTSEA : n=18 ; Ischémique : n=7, +MTSEA : n=8). \*\*\*  $p < 0.001$ , T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

#### 3.4.4 L'ischémie ne modifie pas les propriétés d'activation des canaux sodiques de type non cardiaque

Par la suite, nous avons analysé l'effet du MTSEA sur la dépendance au voltage de l'activation des canaux sodiques. La **figure 3.4.4A** correspond aux courbes d'activation présentées auparavant et ne montre aucune différence entre les conditions contrôle et ischémique. Après ajout de 2 mM de MTSEA, les potentiels de demi-activation sont de  $-35.9 \pm 0.3$  mV et de  $-37.6 \pm 0.2$  mV et ne sont pas statistiquement différents ( $p > 0.05$ , F-Test ; **Figure 3.4.4B**). L'ischémie n'a donc pas modifié le  $V_{1/2}$  des canaux MTSEA insensibles (nNavs). Néanmoins, le MTSEA a significativement décalé les  $V_{1/2}$  contrôle et ischémie vers des potentiels plus hyperpolarisés ( $p < 0.05$ , F-test). Ce décalage observé après le blocage de NaV1.5 va à l'encontre des propriétés biophysiques des nNavs, car ils présentent un  $V_{1/2}$  plus positif. Cela peut s'expliquer par la présence d'ions chargés positivement sur les molécules de MTSEA. Les limites de l'utilisation du MTSEA sont abordées dans la section **3.4.6** des résultats.

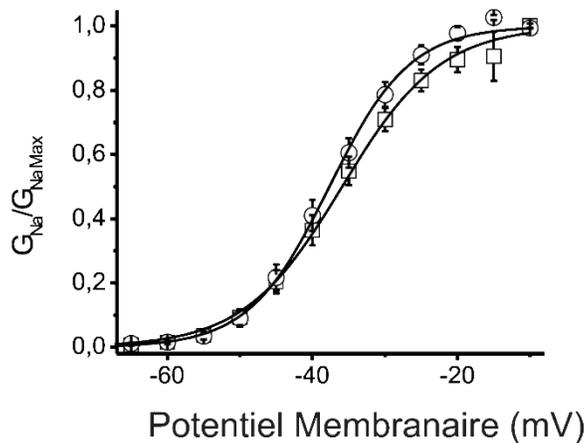
A)



**Figure 3.4.4 L'ischémie ne modifie pas l'activation des canaux sodiques de type 1.5 et neuronaux**

**A) et B)** Relation courant-voltage (I/V) exprimée en densité de courant (pA/pF). Tous les courants de pics enregistrés ont été normalisés par la capacitance de leur cellule respective et sont représentés en fonction du potentiel appliqué. Les valeurs de conductance pour chaque potentiel ont été calculées suivant le rapport  $I_{Na}/(V_m - E_{Na})$  et les courbes lissées selon la formule de Boltzmann. L'ischémie n'a pas modifié la dépendance au voltage de l'activation des canaux sodiques. (Contrôle : n=25 ; +MTSEA: n= 18 ; Ischémie : n=7 ; +MTSEA : n=8). Valeurs  $\pm$  SEM.

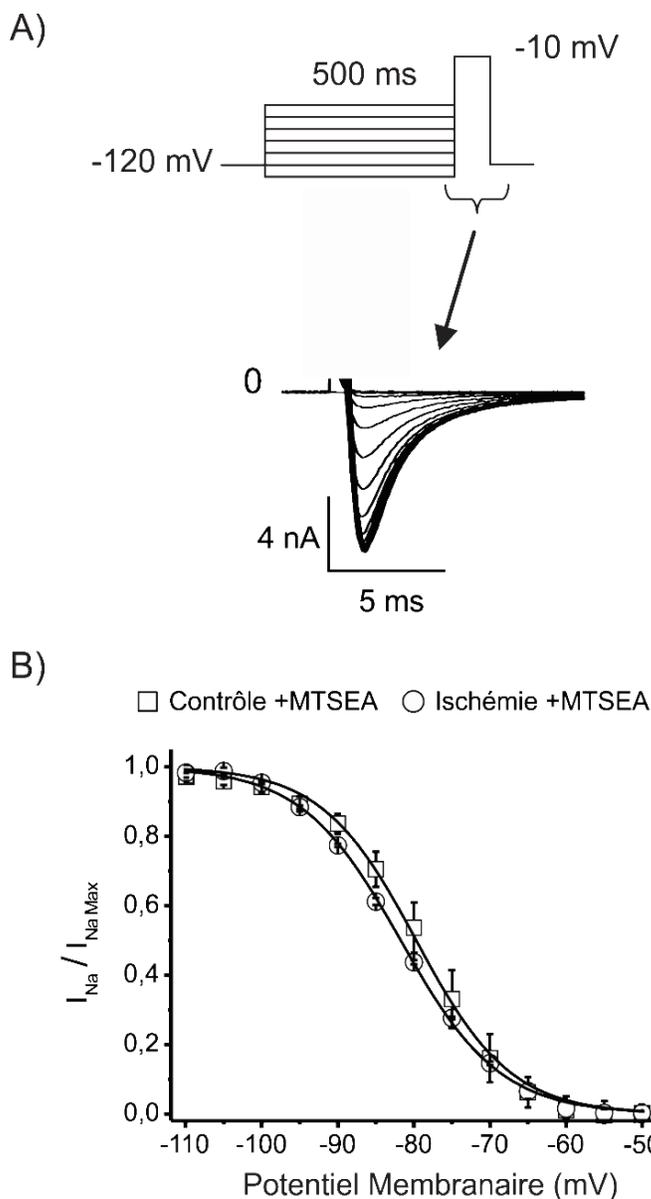
B)



**3.4.5 L'ischémie ne modifie pas la disponibilité des nNaVs**

Les résultats précédents nous indiquent que l'ischémie diminuait l'amplitude du courant  $I_{Na, Max}$  sans modifier l'activation des canaux sodiques de type 1.5 et neuronaux ni leur participation au courant maximum. Cependant, nos résultats montrent que l'ischémie diminuait la disponibilité des canaux sodiques. Afin de déterminer si l'ensemble des canaux sodiques présentait une diminution de leur disponibilité en condition ischémique, nous avons analysé les paramètres d'inactivation des canaux sodiques en présence de 2 mM de MTSEA. La **figure**

**3.4.5B** montre qu'après ajout de MTSEA, les courbes de disponibilité ne sont plus significativement différentes (**Tableau 5** ;  $p > 0.05$ , F-Test). Cela signifie qu'en condition ischémique, les nNavs ne présentent pas de diminution de leur disponibilité et que seuls les canaux de type 1.5 sont affectés. Par conséquent, nos résultats indiquent que l'ischémie modifie uniquement les paramètres d'inactivation des canaux sodiques de type 1.5 et que la disponibilité des nNavs est maintenue. Sachant que les nNavs sont principalement exprimés au niveau des disques intercalaires, ce résultat est donc très intéressant puisqu'il suggère que ces canaux pourront participer normalement à la transmission de l'influx électrique en condition ischémique.



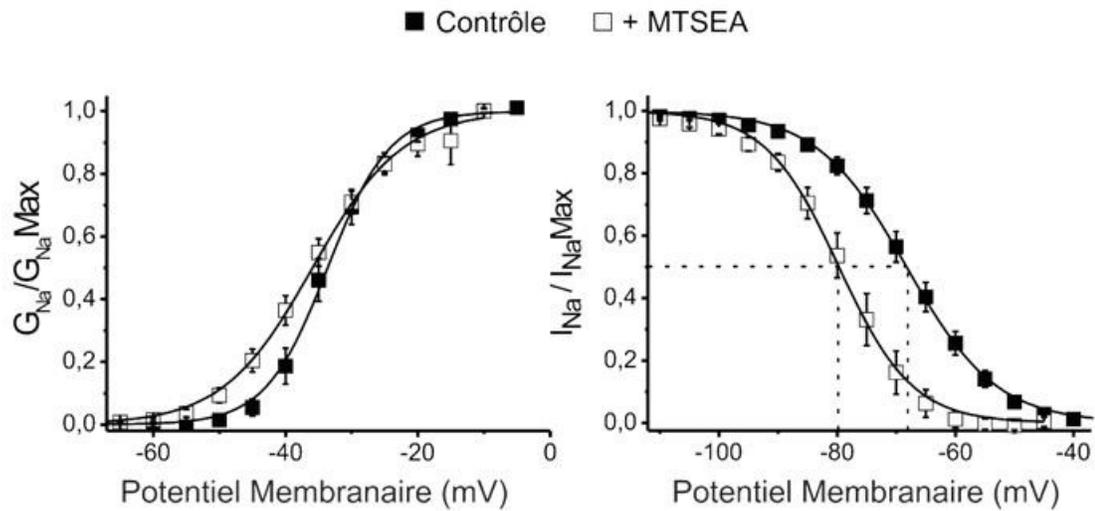
**Figure 3.4.5 L'ischémie ne modifie pas la disponibilité des canaux MTSEA insensibles**

**A)** Le protocole standard de stimulation utilisé afin de mesurer la disponibilité des canaux sodiques consiste en une série d'impulsions de conditionnement de 500 ms par incrément de 5 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -120 mV, suivie d'un pulse test à -10 mV. La partie du bas représente un tracé de courant représentatif où seule la partie correspondante au pulse test est représentée. **B)** Les courbes d'inactivation contrôle +MTSEA et ischémie +MTSEA ont été obtenues selon le rapport ( $I_{Na}/I_{Na,Max}$ ) et lissées selon la formule de Boltzmann. (Contrôle +MTSEA:  $n=8$  ; Ischémie +MTSEA:  $n=9$ ). Valeurs  $\pm$  SEM.

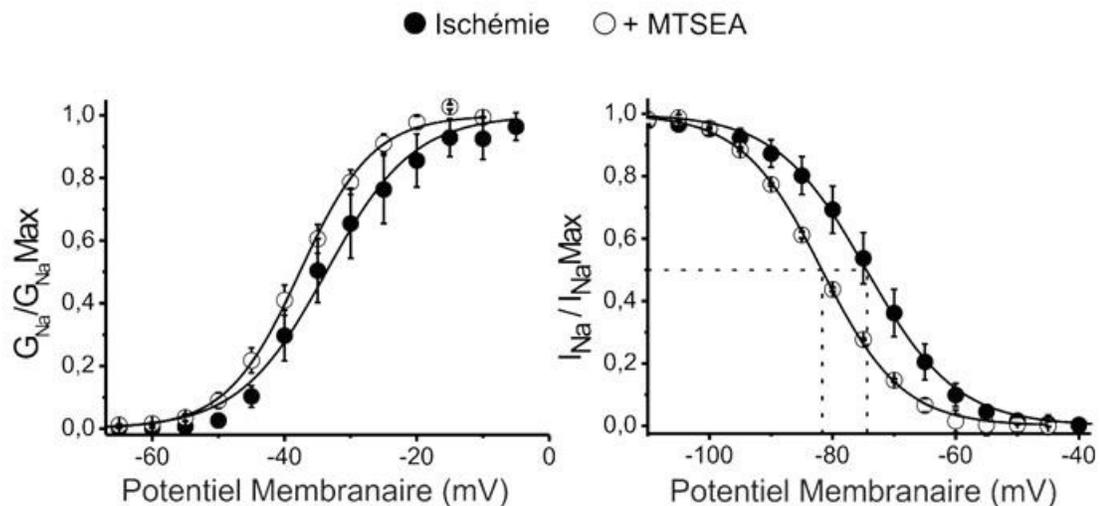
### 3.4.6 Limites d'utilisation du MTSEA

Les courbes d'activation et d'inactivation des nNaVs sont décalées vers des potentiels plus positifs (**Figure 1.10**). Le blocage de NaV 1.5 par le MTSEA devrait donc entraîner un décalage positif des courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ . Cependant, l'utilisation du MTSEA démontre quelques limites. En effet, comme le montre la **figures 3.4.6**, le MTSEA décale les courbes d'activation et d'inactivation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs en conditions contrôle et ischémie. Le MTSEA possède deux charges positives et vient se loger directement à l'intérieur du pore du canal. Il est donc fort probable qu'un 'écran de charge' se crée autour de chaque canal de type NaV1.5. Cet écran de charge peut avoir pour effet de modifier le fonctionnement des canaux présents à proximité selon le mécanisme de Gouy-Chapman (Hille *et al.*, 1975). Néanmoins, d'après les **figures 3.4.4** et **3.4.6**, l'ischémie ne semble pas altérer la liaison NaV1.5-MTSEA. En effet, après l'application de 2 mM de MTSEA les  $V_{1/2}$  contrôles et ischémiques ne sont plus statistiquement différents. Il semble donc que les différences observées après l'ajout de MTSEA pour les courbes  $h_{\infty}$  entre les conditions contrôle et ischémique soient principalement dues à une diminution de la disponibilité des canaux NaV1.5 et/ou à une modification d'expression des différents types de canaux sodiques.

### A) Contrôle



### B) Ischémie



**Figure 3.4.6 Le MTSEA décale les courbes d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés pour les conditions contrôle et ischémique**

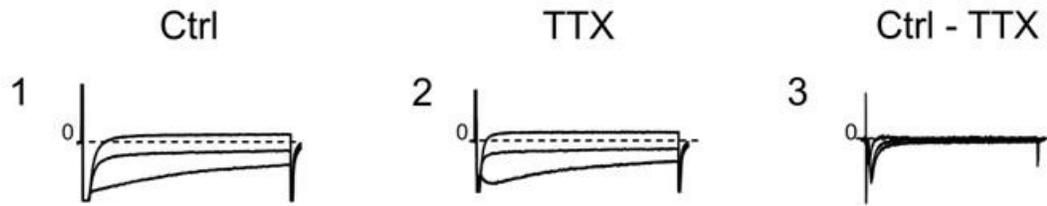
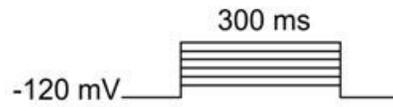
**A) et B)** Courbes d'activation et d'inactivation contrôle et ischémique avant et après ajout de 2 mM de MTSEA. Le MTSEA a significativement décalé les courbes de disponibilité contrôle et ischémique vers des potentiels plus négatifs. ( $p < 0.05$ , F-test). Valeurs  $\pm$  SEM.

### 3.4.7 L'ischémie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$

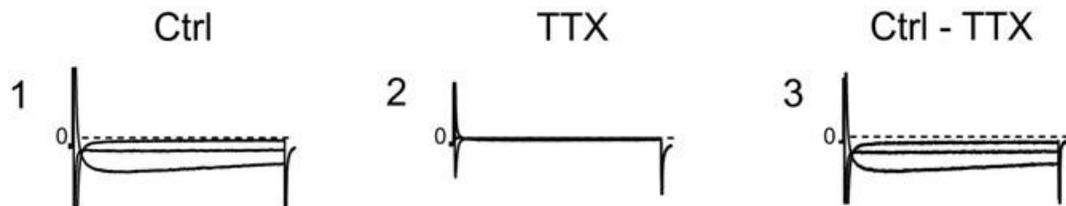
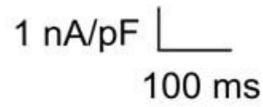
Nos résultats montrent donc que l'ischémie diminue l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  et la disponibilité des canaux de type NaV1.5. L'analyse du courant soutenu peut également être très intéressante afin de déterminer si une autre population de canaux sodiques est surexprimée en condition ischémique. En effet, les nNaVs participent davantage au courant soutenu qu'au courant de pic (10%, **figure 3.4.3**). Les canaux sodiques de type cardiaque diffèrent des nNaVs sur deux points importants. Premièrement, les canaux sodiques de type cardiaque sont plus résistants à la TTX (de l'ordre du micro molaire) que leurs homologues neuronaux (de l'ordre du nano molaire). Deuxièmement, les nNaVs présentent une composante soutenue de plus grande amplitude que les canaux sodiques de type cardiaque (Li et al., 2009). Afin de déterminer l'amplitude de la composante soutenue totale en conditions contrôle et ischémique, nous avons perfusé une forte concentration de TTX (25  $\mu$ M) ce qui nous a permis de bloquer à la fois NaV1.5 et les nNaVs. Le protocole de stimulation utilisé est illustré dans l'encart de la **figure 3.4.7** et dure 300 ms. Les mesures d'amplitudes ont été effectuées au bout de ces 300 ms afin de ne mesurer que la composante soutenue du courant sodique. La **figure 3.4.7A** montre un exemple représentatif des résultats obtenus. L'amplitude du courant soutenu TTX 'sensible' est obtenue par la soustraction du courant restant après application de 25  $\mu$ M TTX au courant contrôle. Puisque nous avons perfusé la TTX, chaque cellule est donc son propre contrôle. En condition contrôle, seul une petite fraction du courant soutenu a été bloquée par la TTX. Après soustraction, nos résultats montrent que l'amplitude totale d' $I_{NaL}$  contrôle est faible. En revanche, la perfusion de 25  $\mu$ M de TTX en condition ischémique a permis de tout bloquer (**Figure 3.4.7A** partie inférieure). Après soustraction, nos résultats montrent que l'amplitude d' $I_{NaL}$  est plus grande en condition ischémique comparativement aux contrôles. La **figure 3.4.7B** montre le rapport entre la conductance du courant soutenu ( $G_L$ ) déterminée par la valeur de la pente de la courbe I/V du courant soutenu et la conductance maximum ( $G_{Max}$ ) déterminée par la valeur de la pente de la courbe I/V du courant  $I_{Na}$  pic, exprimé en pourcentage. Ce rapport nous permet donc de normaliser l'amplitude du courant soutenu par

rapport à l'amplitude du courant  $I_{Na}$  pic. Nos résultats montrent que l'ischémie a significativement augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$ . L'ischémie a doublé voire triplé l'amplitude d' $I_{NaL}$  et ce pour toutes les valeurs des potentiels étudiés. À +10 mV, l'amplitude d' $I_{NaL}$  correspond à  $0.29 \pm 0.05\%$  d' $I_{Na}$  pic alors qu'en condition ischémique, l'amplitude d' $I_{NaL}$  correspond à  $0.69 \pm 0.13\%$  d' $I_{Na}$  pic. L'ischémie semble donc modifier la nature des canaux sodiques participant à  $I_{NaL}$ . De plus, nos résultats indiquent que ces canaux sont sensibles à la TTX.

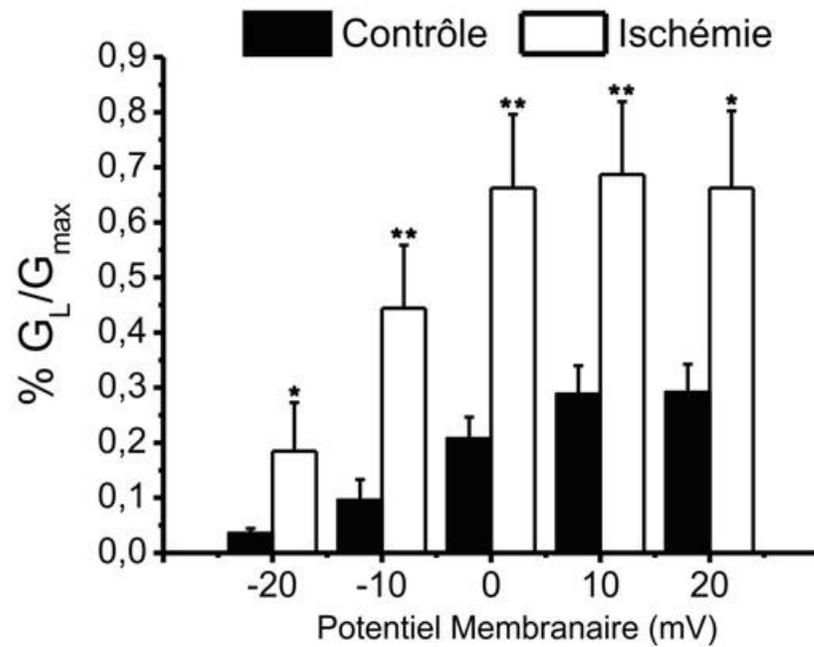
A) Contrôle



Ischémie



B)



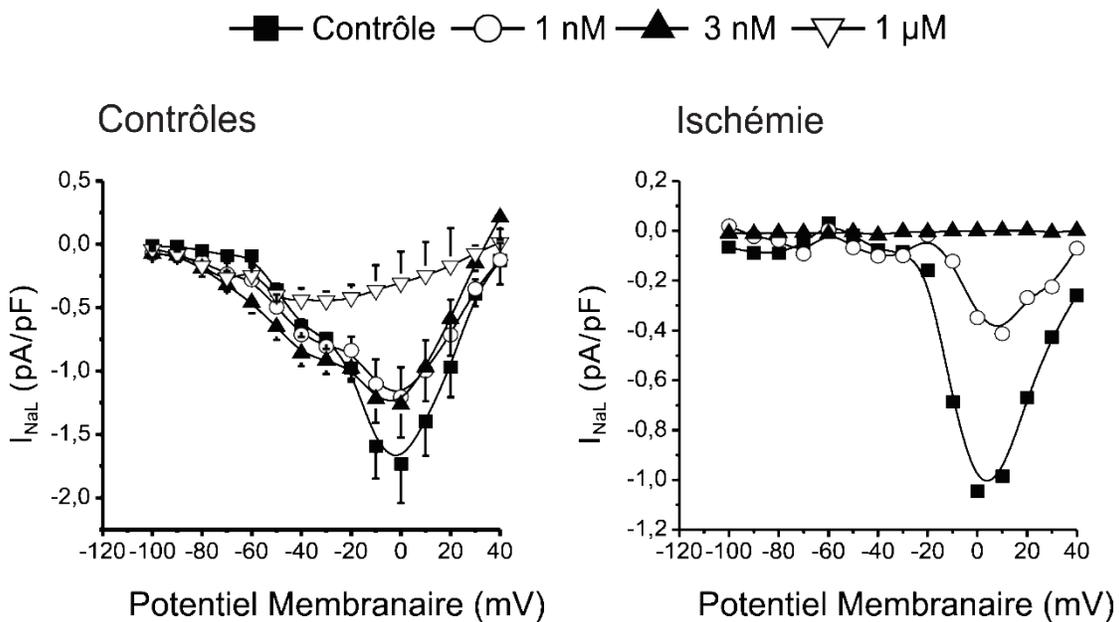
**Figure 3.4.7 L'ischémie augmente l'amplitude de la composante soutenue du courant sodique ( $I_{NaL}$ )**

**A)** L'encart correspondant au protocole de stimulation utilisé afin de mesurer  $I_{NaL}$  consiste en une suite de stimulations maintenues pendant 300 ms de -20 mV à +20 mV par incrément de 10 mV à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Les amplitudes d' $I_{NaL}$  ont été mesurées à la fin des 300 ms. L'application de 25  $\mu$ M de tétrodoxtine (TTX) permet de bloquer totalement la composante soutenue du courant sodique (NaV1.5 et nNaVs). Les tracés de courants illustrés en **A)** et **B)** correspondent aux **(1)** tracés d' $I_{NaL}$  contrôles, **(2)** après perfusion de 25  $\mu$ M de TTX et **(3)** à l'amplitude du courant soutenu sensible à 25  $\mu$ M de TTX obtenue suite à la soustraction suivante :  $I_{Na}$  contrôle -  $I_{Na} + 25 \mu$ M de TTX. Après soustraction, l'amplitude résiduelle d' $I_{NaL}$  est plus grande en condition ischémique. **B)** Histogramme représentant l'amplitude du courant  $I_{NaL}$  par rapport au courant de pic  $I_{Na}$  exprimé en pourcentage en fonction du potentiel appliqué. L'amplitude d' $I_{NaL}$  par rapport au pic est exprimée en fonction du rapport entre la valeur de la conductance soutenue ( $G_L$ ) divisée par la conductance maximale ( $G_{Max}$ ). Les barres noires correspondent aux conditions contrôles (n=14) et les blanches aux conditions ischémiques (n=9). Pour chaque potentiel étudié, l'amplitude d' $I_{NaL}$  est deux à trois fois plus grande en condition ischémique qu'en condition contrôle. \*p<0.05, \*\*p<0.01 T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

**3.4.8 Résultats préliminaires sur le taux de participation des nNaVs à  $I_{NaL}$**

Par la suite, nous avons voulu déterminer la nature des canaux responsables de l'augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  induite par l'ischémie. Pour cela, nous avons perfusé diverses concentrations de TTX (1 nM, 3 nM et 1  $\mu$ M) afin de discriminer les différents de types de canaux sodiques participant à  $I_{NaL}$ . Avant d'analyser les résultats, il est bon de rappeler que le pic de courant des canaux sodiques de type NaV1.5 se situe à -30 mV et que leur sensibilité à la TTX est de l'ordre du micro molaire. Concernant les nNaVs, le pic de courant se situe entre 0 et +10 mV et ils sont sensibles à de plus faibles concentrations de TTX (de l'ordre du nano molaire). En condition contrôle, on s'aperçoit que contrairement au pic situé à 0 mV, l'amplitude du pic à -30 mV n'est pas diminuée par la perfusion de 1 nM et 3 nM. Cependant, la perfusion de TTX (1  $\mu$ M) permet de diminuer l'amplitude des deux pics. Ces résultats concordent avec la distribution des canaux sodiques selon leur pic d'amplitude et leur sensibilité à la TTX. En revanche, en condition ischémique, seul le pic à 0 mV est présent. De plus, ce pic s'avère être très sensible à de faibles concentrations de TTX puisque celui-ci est totalement bloqué par 3 nM de TTX. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'ischémie augmente la contribution des nNaVs à  $I_{NaL}$ . Plus précisément, nos

résultats semblent montrer qu'en condition ischémique, le courant sodique soutenu est exclusivement généré par des nNaVs. Ces résultats confortent ceux obtenus précédemment sur l'amplitude totale d' $I_{NaL}$  (**Figure 3.4.7**). En effet, nos résultats montraient que contrairement aux contrôles, le courant  $I_{NaL}$  ischémique était totalement bloqué par 25  $\mu$ M TTX. Nos résultats préliminaires nous permettent donc de supposer que l'augmentation d' $I_{NaL}$  observée en condition ischémique semble être essentiellement due à une augmentation de la contribution des nNaVs, ce qui expliquerait par la même occasion la plus grande sensibilité d' $I_{NaL}$  à 25  $\mu$ M de TTX observée en condition ischémique.



**Figure 3.4.8 Résultats préliminaires sur le taux de participation des différents types de NaVs participant à  $I_{NaL}$**

L'ischémie augmente la contribution des nNaVs à  $I_{NaL}$ . Courbes I/V contrôle et ischémique d' $I_{NaL}$  en fonction de la concentration de TTX perfusées. Le protocole utilisé est le même que celui décrit auparavant. Les mesures d'amplitudes d' $I_{NaL}$  ont été prises à la fin des 300 ms des pulses tests et normalisées par rapport à la taille des cellules respectives. (Contrôles : n=6 ; Ischémie : n=1). Valeurs  $\pm$  SEM.

	Contrôle		Ischémie	
	Contrôle	MTSEA	Contrôle	MTSEA
$I_{Na}$ , pA/pF	$-78.8 \pm 5.7$	$-8.6 \pm 1.4^{+++}$	$-53.4 \pm 9.2^*$	$-5.5 \pm 0.7^{+++}$
$G_{Na, Max}$ , pS/pF	$2.7 \pm 0.1$	-	$2.7 \pm 0.2$	-
<b>Activation</b>				
$V_{1/2}$ , mV	$-33.7 \pm 0.4$	$-35.9 \pm 0.3$	$-33.6 \pm 0.2$	$-37.6 \pm 0.2^\dagger$
k, mV	$4.7 \pm 0.2$	$6.8 \pm 0.2$	$6.6 \pm 0.4$	$5.5 \pm 0.2$
<b>Inactivation</b>				
$V_{1/2}$ , mV	$-68.3 \pm 0.2$	$-79.7 \pm 0.3^\dagger$	$-74.5 \pm 0.2^*$	$-81.7 \pm 0.2^\dagger$
k, mV	$7.6 \pm 0.1$	$6.2 \pm 0.3$	$7.3 \pm 0.2$	$6.5 \pm 0.1$

**Tableau 5 Paramètres biophysiques du courant sodique pour les conditions contrôle et ischémique**

$I_{Na}$  correspond au courant sodique ;  $G_{Na, Max}$  à la conductance maximum ;  $V_{1/2}$  au potentiel de demi-(in)activation ; k au facteur de pente de l'(in)activation ;  $\tau_r$  et  $\tau_l$  aux constantes de temps rapide et lente de la réactivation. \* $P < 0.05$  ischémie vs contrôle, T-test et F-test;  $^\dagger P < 0.05$  MTSEA vs contrôle, F-test;  $^{+++} P < 0.001$  MTSEA vs contrôle, T-test. Valeurs  $\pm$  SEM.

*En résumé, nous avons analysé dans cette étude l'impact de l'ischémie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques. Nos résultats montrent que l'ischémie diminue l'amplitude maximum d' $I_{Na}$  mais sans modifier les paramètres d'activation des canaux sodiques. L'analyse de la dépendance au voltage de l'inactivation des canaux sodiques montre que l'ischémie diminue la disponibilité. Cependant, au niveau cardiaque, plusieurs types de canaux sodiques participent aux courants  $I_{Na, Max}$  et  $I_{NaL}$ . Les expériences réalisées avec le MTSEA ont montré que l'ischémie ne changeait pas le ratio de canaux de type 1.5 et nNavs participant à  $I_{Na, Max}$  (10% pour les nNavs et 90% pour 1.5). En revanche, nos résultats montrent que l'ischémie a augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Ce résultat paraît*

étonnant au vu de la diminution d' $I_{Na, Max}$ . Néanmoins, les nNaVs participent davantage au courant sodique soutenu comparativement au courant de pic. Nos résultats très préliminaires permettent tout de même de constater que l'ischémie semble modifier le profil de canaux participant à  $I_{NaL}$  et que celui-ci semble être essentiellement généré par des canaux sodiques de type nNaVs. Ces résultats concordent avec l'augmentation d'amplitude d' $I_{NaL}$  totale qui présente une plus grande sensibilité à la TTX en condition ischémique. De plus, nos résultats semblent indiquer que les seuls les canaux de type 1.5 présentent une diminution de leur disponibilité en condition ischémique. Finalement, de par leur localisation, leur rôle dans la transmission de l'onde de dépolarisation au niveau cardiaque ainsi que leur disponibilité, les nNaVs semblent agir comme un mécanisme de sauvegarde dans le but de maintenir et d'assurer la transmission de l'influx électrique dans des régions ischémiques.

## Chapitre IV: Discussion & Conclusions

### 4.1 Étude de l'impact d'une augmentation d'acides gras libres circulants sur le courant sodique cardiaque chez le chien

Nous avons montré qu'une co-perfusion d'Intralipide-Héparine (IH) augmente le taux plasmatique d'AGNE et TG sans modifier le niveau des hormones de stress. Ces résultats confirment que les modifications observées sur  $I_{Na}$  sont donc liées au changement de concentration d'acides gras libres circulants. Nous avons montré qu'une co-perfusion d'IH augmente le courant  $I_{Na, Max}$  de 41% et décale le potentiel de demi-activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs. Il est bien connu que de tels changements peuvent augmenter l'excitabilité. Physiologiquement, un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs se traduit par une baisse du seuil d'activation des canaux sodiques et donc une augmentation de l'excitabilité qui sera renforcée par l'augmentation de l'amplitude d' $I_{Na, Max}$ . Nos résultats montrent également que la co-perfusion d'IH entraîne une légère diminution de la disponibilité des canaux sodiques. Ces résultats ne coïncident pas avec l'augmentation d'amplitude d' $I_{Na}$  observée sur la courbe I/V ce qui indique que l'augmentation du courant maximum sodique est principalement due au décalage négatif de la courbe d'activation.

Il a déjà été démontré qu'une modification du contenu lipidique de la membrane plasmique des cardiomyocytes peut moduler les paramètres biophysiques des canaux sodiques. Dans des cultures de cardiomyocytes de rats et de muscle cardiaque, l'EPA, le DHA et d'autres acides gras polyinsaturés (PUFAs) augmentent le seuil de déclenchement de potentiel d'action, inhibent  $I_{Na}$  et accélèrent la cinétique d'inactivation (Xiao *et al.*, 1995; Leifert *et al.*, 1999, 2000). Des effets similaires ont également été rapportés sur les canaux NaV1.5 exprimés dans des cellules HEK (Moreno *et al.*, 2012; Pignier *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2005). Une partie de ces observations peut s'expliquer par un changement de

fluidité membranaire autour du canal sodique (Lundbaek *et al.*, 2004). Cette hypothèse semble cohérente avec un changement dans les paramètres d'activation des canaux sodiques puisque les structures impliquées dans l'activation sont présentes au niveau transmembranaire et intégrées dans la membrane plasmique tandis que le mécanisme d'inactivation est présent dans le milieu hydrophobe intracellulaire. Cependant, les effets liés à une modification de la fluidité membranaire sur le potentiel de demi-activation des canaux sodiques présents *in vivo* dans notre étude sont à l'opposé de ceux observés *in vitro* dans les études rapportées précédemment. Bien que des différences inter-espèces puissent être impliquées, il est important de noter que dans les études *in-vitro* citées ci-dessus, les myocytes ont été exposés moins longtemps aux lipides (10 à 50 minutes). Par conséquent, seuls les effets aigus d'une exposition aux acides gras ont été mesurés. Il est également probable qu'*in vivo* des mécanismes d'adaptation participent à la modulation d' $I_{Na}$ . La divergence de nos résultats obtenus *in vivo* suggère l'implication d'autres mécanismes de régulation, possiblement liés à la  $\beta$ -oxydation et l'activation de mécanismes de phosphorylation, durant les huit heures de perfusion.

Étonnamment, il s'avère que huit heures de perfusion d'IH suffisent pour induire des changements durables sur les propriétés biophysiques d' $I_{Na}$  puisque les enregistrements ont été effectués durant les trois jours qui ont suivi l'isolement cellulaire (limite du temps de survie des cardiomyocytes isolés). Un tel remodelage électrophysiologique aussi rapide et précoce de cardiomyocytes cardiaques est une nouvelle découverte. Nos résultats montrent qu'une diète riche en acide gras peut induire un remodelage cardiaque en seulement quelques heures après la prise du repas. Une des hypothèses émergentes de nos résultats est que l'exposition *in vivo* à de fortes concentrations d'acides gras libres module les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques par un second mécanisme induisant un changement plus durable de ces propriétés dans un laps de temps relativement court. Bien que le mécanisme exact reste à être identifié, il est susceptible d'être lié à une  $\beta$ -oxydation et peut induire une modulation d' $I_{Na}$  par des dérivés réactifs de l'oxygène, la phosphorylation par la PKC ou PKA qui sont

connus pour modifier les propriétés biophysiques et l'expression des canaux sodiques (Frohnwieser *et al.*, 1997; Hallaq *et al.*, 2006, 2012; Liu *et al.*, 2010, 2013; Lu *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1997; Schreibmayer *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2000).

Le décalage du courant de fenêtre vers des potentiels plus négatifs induit par la perfusion d'IH est également intéressant et peut avoir deux effets bien établis. Premièrement, cela va augmenter le courant de fuite sodique entrant, proche de -80 mV, ce qui va causer une dépolarisation du potentiel membranaire de repos. Additionné au décalage vers des potentiels plus négatifs observés sur la courbe d'activation, cela va augmenter l'excitabilité cardiaque. Le second effet de l'augmentation du courant de fenêtre pour des potentiels proches du potentiel membranaire de repos est la présence d'un courant sodique entrant. Cette entrée de sodium va donc augmenter la concentration intracellulaire en ion sodium et ainsi diminuer le gradient de concentration. Le gradient de concentration du sodium joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie du calcium en modulant directement le sens du fonctionnement de l'échangeur NCX. Une diminution du gradient sodique se traduit par une diminution de l'expulsion du calcium intracellulaire. Ces mécanismes sont très bien décrits dans des cas d'hypertension, d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque (Dhalla *et al.*, 1988; Hobai et O'Rourke, 2000; Kranias et Bers, 2007; O'Rourke *et al.*, 1999).

L'ischémie cardiaque entraîne un changement de métabolisme du myocarde qui devient anaérobie ainsi qu'une accumulation d'acides gras. Dans les cas les plus graves, la relâche de catécholamines induite par l'ischémie accentue la relâche d'acides gras des tissus adipeux. Des observations cliniques ont montré qu'une concentration élevée d'AG libres plasmatiques était associée à une augmentation du risque d'arythmies cardiaques lors d'infarctus du myocarde, tandis que la restauration de la glycolyse au niveau du myocarde présente des effets protecteurs (Oliver et Opie, 1994). Nos résultats montrent qu'une élévation d'AG libres circulants diminue la valeur du voltage permettant l'ouverture des canaux sodiques et augmente l'amplitude du courant de fenêtre ce qui nous

indique qu'une augmentation de l'excitabilité cardiaque liée à une augmentation de la concentration intracellulaire en ions sodium font parties des mécanismes physiopathologiques conduisant à l'augmentation de l'incidence des arythmies.

Une augmentation de la concentration plasmatique en AG libres entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas ce qui constitue un facteur de risque dans le développement d'une résistance à l'insuline menant finalement à un diabète de type 2. De plus, il est intéressant de noter que la plupart des études utilisant des modèles de souris diabétiques sans modification génétique montrent que les taux de calcium intracellulaire sont plus élevés, sans pour cela modifier l'amplitude du courant calcique de type L (Bracken *et al.*, 2006; Lacombe *et al.*, 2007; Lengyel *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2006). Ces résultats vont à l'encontre d'un potentiel rôle de  $I_{CaL}$  dans l'augmentation du calcium intracellulaire observée dans le diabète de type 2. Nos résultats montrent en contrepartie qu'une altération de  $I_{Na}$  pourrait significativement participer à ce processus. Des études ont démontré que les cœurs diabétiques sont caractérisés par une augmentation du calcium intracellulaire conduisant finalement à une insuffisance cardiaque. L'altération du fonctionnement de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA) a été proposée comme une possible explication des CD dans des modèles de diabètes de type 1 et 2 (Fredersdorf *et al.*, 2012; Zarain-Herzberg *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 2001). Cependant, dans ces études, aucune explication n'est donnée sur le mécanisme initiateur menant à la dérégulation du calcium intracellulaire. L'augmentation du courant de fenêtre observée dans notre étude pourrait être à l'origine de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium via l'échangeur NCX et entraîne une augmentation de la durée du plateau des PA ventriculaires. De plus, le courant de fenêtre est augmenté pour des potentiels proches du potentiel membranaire de repos (de -80 mV à -40mV). Cela peut donc entraîner un ralentissement de la diastole et une dépolarisation du potentiel diastolique. Nos résultats montrent également que le traitement IH a décalé négativement les courbes  $I/V$  et  $m_{\infty}$  des canaux sodiques, contribuant ainsi à l'augmentation de l'excitabilité cardiaque, mais a diminué leur disponibilité. Le décalage négatif de la courbe  $h_{\infty}$  peut être responsable d'une diminution de

l'amplitude maximale des PA ventriculaires et diminuer l'efficacité de la systole. Les insuffisances cardiaques liées au diabète pourraient donc provenir d'une augmentation de l'excitabilité cardiaque associée à une augmentation de la DPA ventriculaire et à une diminution de l'amplitude maximale des PA. Ces résultats concordent avec les premières étapes caractéristiques du développement des insuffisances cardiaques reliées aux CD (Belke et Dillmann, 2004; Belke et al., 2004). Nos résultats suggèrent donc un nouveau mécanisme selon lequel un changement au niveau des paramètres biophysiques d' $I_{Na}$  entrainerait une modification du gradient de concentration des ions sodium, qui entrainerait alors une altération de l'homéostasie calcique en parallèle à l'augmentation plasmatique d'AG libres et au développement de la résistance à l'insuline. Notre étude montre également que l'adaptation cardiaque à une diète riche en acide gras est rapide. Dans ce cas, une exposition répétée à de fortes concentrations d'acides gras libres circulant peut engendrer un remodelage chronique du cœur. Pour cette raison, il est tentant de penser que le remodelage électrique cardiaque est déclenché par les AG libres et que ce remodelage s'établit bien avant que la résistance à l'insuline apparaisse ou qu'un diabète de type 2 soit cliniquement détecté.

En résumé, nous avons montré qu'une infusion de PUFAs pendant huit heures chez le chien augmentait l'amplitude du courant  $I_{Na}$  de 41%, diminuait la valeur du potentiel membranaire correspondant à l'ouverture des canaux sodiques et augmentait le courant de fenêtre d' $I_{Na}$ . Ces résultats sont compatibles avec une augmentation de l'excitabilité et de la concentration intracellulaire en calcium qui sont des facteurs potentiellement impliqués dans le développement d'arythmies ventriculaires associées à une augmentation plasmatique de la concentration en AG libres telles que celles observées au cours d'ischémie ou de diabète. Cependant, même si notre modèle animal s'avère tout à fait adapté pour étudier *in vivo* les effets d'une exposition aiguë à de fortes concentrations plasmatiques d'AG libres, il ne tient pas compte de l'hyperlipidémie chronique et de l'hyperglycémie qui se développent de façon concomitante au cours du diabète. Par conséquent, d'autres études seront donc nécessaires afin de déterminer si une exposition chronique d'AG libres se traduira par le développement de cardiomyopathie chez

le chien et si celles-ci seront accompagnées de changements dans les propriétés biophysiques du courant  $I_{Na}$  cardiaque.

#### **4.2 Effet d'une exposition *in-utero* à la nicotine sur le courant sodique**

Les canaux sodiques sont responsables de la phase de dépolarisation d'un potentiel d'action. Ils sont également impliqués dans la conduction et l'excitabilité cardiaque. Une modification des propriétés biophysiques et/ou de l'expression des canaux sodiques peut avoir de graves conséquences. En effet, aucun potentiel d'action ne peut être déclenché si l'amplitude du courant  $I_{Na}$  diminue de façon trop importante. Les contractions cardiaques dépendent donc fortement du fonctionnement des canaux sodiques. Dans le syndrome de mort subite du nouveau-né (SMSN), les enfants souffrent d'apnées prolongées du sommeil et entrent en bradycardie. Cependant, ils sont dépourvus de réflexe d'auto-réanimation. Le système responsable d'augmenter le rythme ainsi que la force des contractions cardiaques fait intervenir les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Notre hypothèse est donc la suivante : un défaut dans la réponse adrénergique au niveau cardiaque peut-il être à l'origine de l'absence de réflexe d'auto-ressuscitation chez les enfants atteints de SMSN?

##### **4.2.1 Effet d'une exposition prénatale (*in-utero*) à la nicotine sur les propriétés biophysiques d' $I_{Na}$ chez le lapin nouveau-né de 37 jours**

Nous avons montré que la nicotine augmentait l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  de 32% et décalait le seuil d'activation de -15 mV ainsi que le courant de pic  $I_{Na}$  de -30 à -40 mV. Nos résultats montrent que la nicotine a décalé le  $V_{1/2}$  d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et augmenté la conductance des canaux sodiques. Pour une valeur de potentiel appliqué de -65 mV, 10% des canaux sodiques sont activés en condition nicotine contre 0% en condition sham. Comme le seuil d'activation chez les animaux traités est plus proche du potentiel membranaire de repos, nos résultats montrent donc que la nicotine a augmenté l'excitabilité cardiaque. L'augmentation significative d' $I_{Na, Max}$  peut être expliquée

par le décalage négatif de la courbe d'activation nicotine. En effet, pour un même potentiel membranaire, plus de canaux sont activés en condition nicotine. Plusieurs études menées chez des patients fumeurs et non-fumeurs ont montré que la nicotine entraîne une augmentation de la pression artérielle ainsi qu'une augmentation du rythme cardiaque (Benowitz *et al.*, 1984, 2002; Mikkelsen *et al.*, 1997). Nos résultats montrent que la nicotine augmente l'excitabilité cardiaque ce qui peut en partie expliquer ces observations. Pourtant, aucune étude s'intéressant aux effets d'une exposition *in-utero* à la nicotine sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques cardiaques n'est présente dans la littérature. Liu *et al.* ont montré une inhibition du courant sodique suite à la perfusion de nicotine (1 nM) sur des cellules du ganglion trigéminal de rat, mais également dans des cellules HEK transfectées avec le gène SCN5A (Liu *et al.*, 2004). Les auteurs montrent que la nicotine n'a pas affecté l'activation, mais a cependant faiblement diminué la disponibilité des canaux sodiques. La divergence de nos résultats peut s'expliquer par la différence des modèles utilisés. Nous avons utilisé un modèle *in vivo* nous permettant de voir les effets d'une exposition prénatale à la nicotine. De plus, nos enregistrements de courants ont été effectués sans perfusion de nicotine. Notre modèle nous a donc permis de mesurer les effets à long terme d'une exposition *in-utero* à la nicotine sur les propriétés biophysiques des NaVs. La nicotine est connue pour ses propriétés anti-apoptotique et peut altérer le développement du système de conduction cardiaque chez un nouveau-né (Hakki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Wielgus *et al.*, 2004). Les effets que nous observons dans notre étude dépendent donc de plusieurs paramètres évoluant au cours du développement de l'embryon et ne se résument pas à une simple exposition des canaux sodiques à la nicotine. Enfin, l'analyse des courbes de disponibilité nous montrent que la nicotine a décalé le  $V_{1/2}$  de demi-inactivation de  $-81,3 \pm 0,2$  mV à  $-85.3 \pm 0.1$  mV. Néanmoins, ce décalage ne s'avère pas statistiquement significatif. L'augmentation de 32% du courant  $I_{Na}$  (**Figure 3.2.1C**) ne peut donc pas être expliquée par un changement de disponibilité des canaux sodiques. De plus, un décalage négatif de la courbe de disponibilité a pour conséquence de diminuer le nombre de canaux disponibles pour des potentiels plus dépolarisés, entraînant une

diminution de l'amplitude d' $I_{Na}$  (**Figure 3.2.2B**). La nicotine doit donc modifier l'amplitude d' $I_{Na}$  et les propriétés biophysiques des canaux sodiques par l'intermédiaire d'autres mécanismes. Navarro *et al.* (1990) ont montré que l'exposition *in-utero* à la nicotine retarde le développement des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques chez le rat (Navarro *et al.*, 1990). Les auteurs précisent, suite à l'utilisation d'isoprotérénol, qu'ils ont observé une hyposensibilité s'expliquant par un problème d'interaction entre l'isoprotérénol et les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Malgré un sevrage de nicotine, les déficiences fonctionnelles liées à l'isoprotérénol ou à une stimulation électrique des nerfs sympathiques persistent à l'âge adulte. Ces résultats nous indiquent donc qu'une exposition *in-utero* à la nicotine modifie sur le long terme la réponse adrénérique au niveau des organes dépendants du système sympathique. L'activité cardiaque est régulée par le système nerveux autonome et par conséquent par le système sympathique. Afin de vérifier si la nicotine altère la réponse adrénérique au niveau cardiaque, nous avons exposé des cardiomyocytes de l'oreillette droite de lapins sham et nicotine à 10  $\mu$ M d'isoprotérénol.

#### **4.2.2 Une exposition *in-utero* à la nicotine abolit la réponse à une stimulation $\beta$ -adrénérique au niveau cardiaque**

Nos résultats montrent que l'isoprotérénol a pratiquement doublé la densité du courant  $I_{Na}$  en condition sham ( $-60,9 \pm 9,2$  pA/pF à  $-115,9 \pm 10,3$  pA/pF) et a décalé le seuil d'activation et le pic  $I_{Na}$  respectivement de -5 mV et -15 mV (**Figure 3.2.3**). En revanche, en condition nicotine, les deux courbes courant-potentiel se superposent. Les valeurs d' $I_{Na, Max}$  obtenues avant et après incubation avec 10  $\mu$ M d'isoprotérénol sont identiques ( $-89,6 \pm 8,3$  pA/pF et  $-90,5 \pm 16,8$  pA/pF). De plus, l'analyse des courbes d'activation montre que l'isoprotérénol a significativement décalé de -14 mV le potentiel de demi-activation en condition sham. Encore une fois, en condition nicotine, les courbes d'activation contrôle et +Isoprotérénol ne sont pas statistiquement différentes. Après application de 10  $\mu$ M d'isoprotérénol, nos résultats montrent que la conductance maximale a augmenté de  $2,5 \pm 0,1$  pS/pF à  $3,1 \pm 0,1$  pS/pF en condition sham alors que les valeurs obtenues en

condition nicotine sont similaires ( $2,9 \pm 0,1$  pS/pF et  $3,0 \pm 0,1$  pS/pF). Finalement, l'analyse des courbes d'inactivation montre que l'isoprotérénol a décalé le potentiel de demi-inactivation des canaux sodiques de  $-81,3 \pm 0,2$  mV à  $-85,3 \pm 0,2$  mV. Ce décalage n'est pas significatif, cependant les valeurs obtenues après l'ajout d'isoprotérénol en condition sham sont identiques à celles obtenues en condition nicotine. Encore une fois, nos résultats montrent que l'isoprotérénol n'a pas changé le potentiel de demi-inactivation en condition nicotine. Il est connu que l'isoprotérénol augmente la densité de courant au niveau cardiaque (Lu *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1992; Yarbrough *et al.*, 2002). Nos résultats montrent donc que contrairement aux lapins sham, les lapins nicotine ne présentent aucune sensibilité à  $10 \mu\text{M}$  d'isoprotérénol. De façon plus marquante, hormis l'amplitude d' $I_{\text{Na, Max}}$ , tous les paramètres biophysiques des canaux sodiques sont identiques entre les conditions sham/+Iso et nicotine. Ces résultats suggèrent fortement la présence d'une dominance sympathique chez les lapereaux de 37 jours exposés *in-utero* à la nicotine et supportent l'étude de Navarro *et al.* En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré qu'une exposition *in-utero* à la nicotine chez le rat retardait le développement des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et entraînait une hyposensibilité à l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) et ce sur le long terme (Navarro *et al.*, 1990). Il semble donc que ce soit cette dominance sympathique (activation continue des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) qui soit à l'origine de l'augmentation d' $I_{\text{Na, Max}}$  observé en condition nicotine (**Figure 3.2.1**). L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entraîne une augmentation de l'activité de la PKA qui est connue pour augmenter l'expression de SCN5A (Hallaq *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2000). Les enfants souffrant du syndrome de mort subite ne présentent aucun réflexe d'AR. Les principaux symptômes apparents sont les suivants : présence d'apnées prolongées du sommeil et apparition de bradycardie. Il est aujourd'hui difficile de déterminer si la défaillance provient en premier des centres respiratoires ou du système nerveux autonome. Néanmoins, nos résultats étayent l'hypothèse d'une défaillance au niveau de la régulation du rythme cardiaque due à la présence d'une dominante sympathique entraînant une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Chez un nouveau-né sain, le

développement d'une bradycardie cardiaque trop prononcée entraîne le déclenchement d'un système de secours qui consiste en une décharge adrénérurgique afin d'accélérer le rythme cardiaque (phénomène d'auto-ressuscitation). Nos résultats montrent que ce système de sauvegarde n'est plus présent chez les lapins nicotine. D'après nos résultats et ceux présents dans la littérature, l'absence de réflexe d'auto-ressuscitation chez les enfants atteints du syndrome de mort subite semble donc principalement due à une défaillance dans la réponse adrénérurgique cardiaque (pas d'accélération du rythme cardiaque suite à une décharge adrénérurgique).

### **4.3 Effet de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques cardiaques. Parallèle entre les troubles neurologiques et cardiaques**

Nos résultats montrent que l'épilepsie a : 1) augmenté l'excitabilité (décalage négatif de la courbe  $I/V$ ); 2) augmenté l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  d'environ 18%; 3) décalé les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$  vers des potentiels plus négatifs; 4) augmenté le temps de réactivation; 5) augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$  en augmentant la contribution des  $nNaVs$ ; 6) modifié l'effet de l'isoprotérénol sur le temps de réactivation et sur les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ ; 7) modifié l'activité de la PKC pour la courbe  $h_{\infty}$  et 8) augmenté de façon constitutive l'activité de la PKA.

#### **4.3.1 Mutations et épilepsie**

Bien que notre étude ne porte pas sur les effets des mutations liées à l'épilepsie, leur étude nous a permis de mieux comprendre les mécanismes menant au déclenchement des crises. Ce paragraphe résume donc les principales mutations découvertes ainsi que les modifications électrophysiologiques qu'elles engendrent. Cependant, ces études présentent l'inconvénient d'avoir été effectuées dans des modèles *in-vitro* mais il sera intéressant de comparer ces résultats aux observations cliniques pour finalement les comparer aux nôtres. Les mutations liées à l'épilepsie ont été découvertes sur les gènes SCN1A (Escayg *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2001a), SCN2A et le récepteur GABA de type 2

(GABRG2) (Sun *et al.*, 2008). Lossin *et al.* ont montré que la mutation T875M présente sur le gène SCN1A augmentait significativement la densité du courant  $I_{Na}$  (Lossin *et al.*, 2002). D'autres ont montré que cette même mutation située au niveau du segment S4, diminuait la disponibilité des canaux en décalant la courbe d'inactivation de -9 mV (Alekov *et al.*, 2001). Spampanato *et al.* ont montré que la mutation T875M, associée à la sous-unité  $\beta$ , augmentait le temps de réactivation (Spampanato *et al.*, 2001). La mutation W1204R (SCN1A) exprimée dans un modèle d'expression hétérologue (tsA201) décalait quant à elle le  $V_{1/2}$  d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Lossin *et al.*, 2002; Spampanato *et al.*, 2003). Les auteurs montrent également que le décalage induit par la mutation est atténué lorsque le canal est co-exprimé avec sa sous-unité  $\beta$  (Spampanato *et al.*, 2003). Plusieurs études ont également montré que les mutations T875M, W1204R et R1648H (SCN1A) entraînaient une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Cossette *et al.*, 2003; Kahlig *et al.*, 2006; Spampanato *et al.*, 2001). Enfin, Shuai Liu *et al.* ont très récemment montré que la mutation I1656M (SCN1A) modifiait la régulation du canal par la PKA (Liu et Zheng, 2013). Ces études ont donc permis de constater que les mutations responsables d'épilepsie augmentaient l'amplitude des courants  $I_{Na, Max}$  et  $I_{NaL}$ , décalaient les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$  vers des potentiels plus négatifs et augmentaient le temps de réactivation des canaux sodiques de type neuronaux. Au vu de ces résultats, nous pouvons constater que les modifications induites par les mutations au niveau des propriétés biophysiques des nNavs sont très similaires aux résultats que nous avons obtenus au niveau cardiaque.

#### **4.3.2 Hyperexcitabilité et épilepsie**

Cependant, plusieurs études ont montré dans des modèles animaux épileptiques dépourvus de mutation que l'épilepsie était responsable d'une surexpression de canaux sodiques de type nNavs au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe (Guo *et al.*, 2008, 2013; Xu *et al.*, 2013) entraînant une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Les crises d'épilepsie sont également caractérisées par une hyperactivité neuronale qui a entre autres pour origine une

hyperexcitabilité des canaux sodiques (Rogawski et Löscher, 2004). La phénytoïne qui est un bloqueur des canaux sodiques est d'ailleurs utilisée comme traitement anti-épileptique. Nos résultats montrent que l'épilepsie a décalé le seuil d'activation des canaux sodiques et la courbe  $m_{\infty}$  vers des potentiels plus négatifs. Le seuil d'activation des canaux est donc plus proche du potentiel membranaire de repos en condition épileptique et cela est bien connu pour augmenter l'excitabilité. Additionnée au décalage de la courbe  $m_{\infty}$ , l'épilepsie permet l'ouverture d'un plus grand nombre de canaux pour des potentiels plus hyperpolarisés. Il semble donc que l'épilepsie, comme au niveau neuronal, augmente l'excitabilité au niveau cardiaque.

#### 4.3.3 $I_{Na, Max}$ et épilepsie

Guo *et al.* ont analysé chez le rat les propriétés des canaux sodiques présents au niveau de l'hippocampe dans un modèle d'épilepsie spontanée et rapportent que l'épilepsie a augmenté l'amplitude d' $I_{Na, Max}$  de 16% et décalé de -7 mV le  $V_{1/2}$  d'activation. Nos résultats montrent que l'épilepsie a significativement augmenté  $I_{Na, Max}$  de 18% et décalé le  $V_{1/2}$  d'activation d'environ -6 mV. Nos résultats montrent également que l'épilepsie a augmenté la conductance des canaux sodiques. L'épilepsie semble donc avoir augmenté l'amplitude du courant  $I_{Na, Max}$  en augmentant le niveau d'expression d'un ou de plusieurs types de canaux sodiques. Cependant, plusieurs paramètres peuvent influencer l'expression des canaux sodiques.

Premièrement, l'épilepsie a déjà été associée à des modifications d'expression de plusieurs types de canaux. Yuki Nagao *et al.* (2013) ont récemment démontré que l'induction du SE par la pilocarpine pouvait également modifier l'expression de canaux potassiques. En effet, leur étude montre par western blot que l'épilepsie a significativement augmenté le niveau d'expression du canal potassique rectifiant entrant (Kir 4.1) dans des astrocytes de cerveau (Nagao *et al.*, 2013). De plus, d'autres études ont montré, au niveau neuronal, une surexpression des canaux sodiques de type neuronaux (NaV1.1, 1.2, 1.3 et 1.6) dans un modèle de rat épileptique dépourvu de mutations (Guo *et al.*, 2008, 2013;

Xu *et al.*, 2013). Les auteurs ont corrélé l'augmentation d'expression des canaux sodiques à l'augmentation d' $I_{NaL}$  qu'ils ont observée. Le parallèle concernant le taux de participation des nNavs et l'augmentation d'amplitude d' $I_{NaL}$  entre le cerveau et le cœur sera développé plus tard, dans la section **4.3.4** de cette discussion. Il est donc fort probable que l'augmentation du courant  $I_{Na, Max}$  que nous observons en condition épileptique ait pour origine une surexpression des canaux sodiques au niveau cardiaque, comme il l'a déjà été établi au niveau neuronal.

Deuxièmement, l'épilepsie est associée à une modification du tonus sympatho-vagal. Ce système est impliqué dans la régulation du rythme cardiaque via les voies sympathique et parasympathique. L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par 10  $\mu$ M d'isoprotérénol augmente le niveau d'expression des canaux sodiques et par conséquent la densité de courant (Yarbrough *et al.*, 2002). De plus, l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entraîne l'activation des protéines kinases A et C qui sont également impliquées dans la modulation du niveau d'expression des canaux sodiques. En effet, Hallaq *et al.* ont montré que l'activation de la PKC diminuait le niveau d'expression de SCN5A, tandis que l'activation de la PKA l'augmentait (Hallaq *et al.*, 2006, 2012). Zhou *et al.* ont également montré que l'activation de la PKA augmentait la densité de courant sodique en favorisant le transport à la membrane des canaux (Zhou *et al.*, 2000).

Concernant l'isoprotérénol, nos résultats montrent que 10  $\mu$ M d'isoprotérénol ont augmenté le courant  $I_{Na, Max}$  de 50 et 52% respectivement pour les conditions sham et épileptique (**Figure 3.3.3.1**). Il est connu que l'isoprotérénol favorise le transport des canaux sodiques stockés dans les cavéoles vers la membrane plasmique (Yarbrough *et al.*, 2002). Tong Lu *et al.* ont enregistré une augmentation d' $I_{Na, Max}$  de 68% chez le rat en utilisant 10  $\mu$ M d'isoprotérénol (Lu *et al.*, 1999) et JJ Matsuda *et al.* de 56% chez le lapin avec 1  $\mu$ M d'isoprotérénol (Matsuda *et al.*, 1992). Le phénomène de transport des stocks de canaux à la membrane est très rapide. Yarbrough *et al.* ont montré une augmentation de 70% du courant  $I_{Na}$  après seulement 4 min de perfusion d'isoprotérénol à une

concentration de 10  $\mu\text{mol/L}$  chez des rats adultes (Yarbrough *et al.*, 2002). Les 30 minutes d'incubation que nous avons effectuées avec l'isoprotérénol s'avèrent donc amplement suffisantes pour augmenter le niveau d'expression des canaux sodiques. Nos résultats sont consistants avec la littérature et l'augmentation du courant  $I_{\text{Na}}$  induite par l'isoprotérénol est probablement due à une surexpression des canaux sodiques. Il est intéressant de noter que l'augmentation d' $I_{\text{Na}}$  induite par l'isoprotérénol est significativement plus importante en condition épileptique comparativement aux sham. En effet, les courants  $I_{\text{Na, Max}}$  sont de  $-149.2 \pm 9.7$  pA/pF et de  $-191,6 \pm 20.5$  pA/pF respectivement pour les conditions sham et épileptique. La densité maximale atteinte en condition épileptique est donc 22% plus élevée qu'en condition sham. Sachant que l'isoprotérénol augmente l'amplitude d' $I_{\text{Na}}$  en favorisant le transport des canaux sodiques stockés dans les cavéoles vers la membrane plasmique, il est fort probable qu'un plus grand nombre de canaux soit disponible dans les cavéoles en condition épileptique. Nos résultats montrent également que l'isoprotérénol a significativement augmenté la conductance maximale des canaux sodiques et décalé négativement le  $V_{1/2}$  d'activation en condition sham et épileptique. Ces résultats concordent avec l'augmentation du courant  $I_{\text{Na}}$  induite par l'isoprotérénol puisqu'il y a plus canaux activables pour des potentiels plus négatifs. Il est connu que l'isoprotérénol possède des propriétés inotrope et chronotrope positifs. Nos résultats vont dans ce sens puisque l'isoprotérénol a décalé le seuil d'activation des canaux sodiques vers des potentiels plus négatifs et cela a pour conséquence d'augmenter l'excitabilité cardiaque. De façon plus générale, les résultats obtenus avec l'isoprotérénol montrent que la réponse adrénergique n'est pas modifiée ou altérée en condition épileptique. Les changements induits par l'épilepsie peuvent donc avoir pour origine une surexpression de nNavs qui possèdent des propriétés biophysiques différentes de Nav1.5. Dans les deux conditions, l'isoprotérénol a augmenté l'amplitude d' $I_{\text{Na, Max}}$ , décalé négativement le seuil et le  $V_{1/2}$  d'activation et augmenté la conductance maximale. De plus, les valeurs des  $V_{1/2}$  sham et épileptique après l'ajout d'isoprotérénol ne sont pas statistiquement différentes. L'épilepsie ne modifie donc pas l'effet maximum d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique

sur le potentiel de demi-activation des canaux sodiques. Néanmoins, l'épilepsie modifie intrinsèquement ces paramètres comme montré précédemment. C'est la raison pour laquelle les décalages observés sont moins importants en condition épileptique. Tous les décalages induits par l'épilepsie vont dans le même sens que ceux induits par l'isoprotérénol. Ces observations montrent que l'épilepsie diminue légèrement la réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique et laissent à penser que les animaux épileptiques sont sous dominance sympathique. L'épilepsie semble donc augmenter l'activité basale et intrinsèque des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entraîne l'activation des protéines kinases C (PKC) et A (PKA) par l'intermédiaire de protéines G stimulatrices et via la voie de l'adénylate cyclase. Afin de déterminer si la dominance sympathique induite par l'épilepsie modifie l'activité de ces deux protéines kinases, nous avons analysé les effets d'un bloqueur de la PKC (chélérythrine) et de la PKA (H-89) sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques.

À propos de la PKC, nos résultats montrent que son inhibition a significativement augmenté la densité du courant  $I_{Na}$  d'environ 42% et 53% respectivement pour les conditions sham et épileptique. De plus, selon nos résultats, l'inhibition de la PKC entraîne un décalage négatif des courbes d'activation. Xiao *et al.* ont montré qu'une activation de la PKC avec du PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) entraînait une diminution du courant sodique. Ils montrent que l'effet du PMA sur  $I_{Na}$  peut être aboli avec l'ajout de calphostine C (un antagoniste de la PKC) (Xiao *et al.*, 2001). Hallaq *et al.* ont démontré que l'activation de la PKC par le PMA diminuait l'amplitude d' $I_{Na}$  et décalait positivement la courbe d'activation (Hallaq *et al.*, 2012). Qu *et al.* ont également montré qu'une activation de la PKC avec du OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) entraînait une diminution de l'amplitude d' $I_{Na}$  de 33% et 56% respectivement pour des potentiels membranaires de maintien de -114 mV et -94 mV (Qu *et al.*, 1994). Nos résultats concordent donc avec la littérature car suite à l'inhibition de la PKC, nous observons une augmentation du courant  $I_{Na}$  et un décalage négatif de la courbe  $m_{\infty}$ . Finalement, l'augmentation de l'amplitude d' $I_{Na}$  en condition épileptique ne semble donc pas provenir d'une modification de l'activité de la PKC.

Nos résultats montrent que l'inhibition de la PKA par le H-89 a augmenté la densité de courant en conditions sham et épileptique et décalé les courbes d'activation et inactivation vers des potentiels plus négatifs. Cependant, le potentiel d'inversion visible sur les courbes I/V sham et épileptique (**Figure 3.3.5.1B**) est décalé vers des potentiels plus positif. Ce décalage positif peut être dû à une augmentation de la concentration extracellulaire en ions  $\text{Na}^+$  suite à une évaporation d'eau lors de l'incubation. Cela pourrait donc être à l'origine de l'augmentation de courant observé dans les deux conditions. L'inhibition de la PKA en condition épileptique semble donc uniquement décaler négativement la courbe  $m_\infty$  sans modifier l'amplitude de  $I_{\text{Na}}$ . En revanche, en condition sham, l'augmentation du courant est plus importante suite à l'inhibition de la PKA et décale davantage la courbe  $m_\infty$  comparativement aux données des rats épileptiques. L'épilepsie semble donc diminuer l'activité de la PKA, ce qui permettrait d'expliquer l'augmentation de  $I_{\text{NaL}}$  via une augmentation de la participation des nNavs en condition épileptique. En effet, il a été démontré que la PKA possédait des effets opposés sur le niveau d'expression des canaux sodiques selon leur isotypes. L'activation de la PKA entraîne une diminution de l'amplitude des courants sodiques TTX-s (Nav1.1 et 1.2) (Vijayaragavan *et al.*, 2004), mais augmente l'amplitude des courants sodiques TTX-r (England *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1996). D'autres études ont également rapporté ce phénomène, puisque selon Zhou *et al.*, l'activation de la PKA entraîne une augmentation du courant sodique généré par SCN5A (Zhou *et al.*, 2000; ovocytes de Xénope) tandis que Liu *et al.* ont montré que son activation diminuait l'amplitude du courant sodique généré par SCN1A (Liu et Zheng, 2013; tsA 201). Les variations d'amplitudes des différents courants sodiques sont induites suite à une modification du niveau d'expression. Il a été démontré que la PKA pouvait augmenter l'expression des canaux sodiques de type Nav1.5. En effet, des expériences faites dans un modèle d'expression hétérologue (HEK) ont montré qu'une stimulation de la PKA augmentait l'amplitude de  $I_{\text{Na}}$  (Zhou *et al.*, 2000). Afin de déterminer si l'augmentation de  $I_{\text{Na}}$  était due à une augmentation du niveau d'expression de Nav1.5, les auteurs ont utilisé de la chloroquine, un agent permettant de perturber le transport des vésicules provenant

du Golgi et se dirigeant vers la membrane plasmique. Les cellules pré-incubées avec de la chloroquine ne montraient plus ou très peu d'augmentation d' $I_{Na}$  après stimulation de la PKA. Ces expériences ont permis de montrer qu'une stimulation de la PKA augmentait le nombre de canaux sodiques présents au niveau de la membrane plasmique. De plus, cette augmentation d'expression est très rapide et même après 60 minutes, l'amplitude du courant ne cesse d'augmenter. Cette adaptation très rapide suite à la stimulation de la PKA est incompatible avec la synthèse de nouveaux canaux qui est un phénomène génomique plus lent. En accord, il a été démontré qu'il existait des réserves intracellulaires de protéines NaV1.5 (Haufe et al., 2005a). Ce stockage est effectué dans les cavéoles et permet un remodelage ionique ainsi qu'une plasticité d'adaptation rapide de la cellule cardiaque. La PKA modifie donc l'activité des canaux sodiques de deux façons : en modifiant les propriétés biophysiques et en permettant la libération des stocks intracellulaires de canaux sodiques. L'augmentation d' $I_{NaL}$  généré par des nNavs en condition épileptique semble donc provenir d'une diminution de l'activité de la PKA qui induit une diminution d' $I_{Na}$  généré par SCN5A et une augmentation d' $I_{Na}$  généré par les nNavs. Un autre facteur important est également impliqué dans la modulation des propriétés biophysiques des canaux sodiques : les sous-unités  $\beta$ . Ce sont des protéines constituées d'un segment transmembranaire situé à proximité du canal. Plusieurs études *in-vitro* ont démontré que l'association du canal NaV1.5 avec une ou plusieurs sous-unités  $\beta$  modifiait à la fois les propriétés biophysiques des canaux sodiques ainsi que le niveau d'expression (Patino et Isom, 2010). De plus, Zhou et al. ont montré dans un modèle d'expression hétérologue que l'augmentation du courant induite par la stimulation de la PKA pouvait être atténuée en présence de sous-unités  $\beta$  (Zhou et al., 2000). Il est donc possible qu'en plus d'une probable diminution de l'activité de la PKA, l'épilepsie modifie également l'expression des sous-unités  $\beta$ . Toutefois, il est important de préciser que le H-89 n'est pas un inhibiteur spécifique de la PKA et qu'il peut potentiellement bloquer d'autres protéines kinase comme la PKC ou encore la calmoduline kinase II (CaMKII) pouvant elles aussi modifier l'expression ou les propriétés biophysiques des NaVs (Ashpole et al., 2012; Hallaq et al., 2012).

#### 4.3.4 L'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ en augmentant la contribution des nNaVs

Nos résultats montrent que l'épilepsie a augmenté l'excitabilité cardiaque, mais également l'amplitude d' $I_{NaL}$ . L'épilepsie semble donc affecter le cœur de la même façon qu'il affecte le cerveau. Plusieurs rapports cliniques se basant sur des enregistrements d'ECG de patients épileptiques ont fait état d'une augmentation significative de l'intervalle QT (Ergul *et al.*, 2013; Hocker *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 2011). Il est connu que le courant soutenu  $I_{NaL}$  participe à la phase de plateau d'un potentiel d'action et peut en faire varier sa durée. En effet, il a été démontré que l'application de TTX peut diminuer la durée d'un potentiel d'action (Huang *et al.*, 2001; Maltsev *et al.*, 1998). Dans notre étude, nous montrons que l'épilepsie a augmenté l'amplitude de la composante soutenue du courant sodique  $I_{NaL}$  d'environ 35%. Nous avons déjà démontré que la moitié du courant  $I_{NaL}$  chez le chien était dû à des canaux de types nNaVs (Biet *et al.*, 2012). Nos résultats montrent également qu'après application de 1 nM de TTX, l'amplitude des courants  $I_{NaL}$  sham et épileptique pour les potentiels appliqués de -30 et -10 mV n'étaient plus différentes. Cela signifie donc que l'augmentation de courant observée en épilepsie est due à des canaux de type TTX sensibles (nNaVs). Au vu de ces observations, nos résultats suggèrent donc fortement que l'augmentation de l'intervalle QT présente sur les ECG de patients épileptiques a pour origine une augmentation de l'amplitude de la composante soutenue d' $I_{NaL}$ . Comme mentionné dans la section Mutations et Épilepsie, les mutations T875M, W1204R et R1648H entraînent une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Alekov *et al.*, 2000, 2001; Cossette *et al.*, 2003; Kahlig *et al.*, 2006; Spampinato *et al.*, 2001). Il est connu que le modèle de rats épileptiques induit par injection de pilocarpine augmente également l'amplitude d' $I_{NaL}$  au niveau des cellules pyramidales de l'hippocampe (French *et al.*, 1990). Dans le même modèle, Chen *et al.* ont déterminé que cette augmentation d' $I_{NaL}$  était de 1.5X au niveau des cellules pyramidales d'hippocampe et qu'elle était totalement bloquée par 1  $\mu$ M de TTX (Chen *et al.*, 2011). Nos résultats concordent fortement avec les données présentes dans la littérature et renforcent le concept qu'une augmentation de nNaVs se produit aussi au niveau

cardiaque. Premièrement, nous avons utilisé le même modèle que dans les études citées précédemment. Deuxièmement, tout comme l'étude portant sur les cellules pyramidales, nos résultats montrent que l'épilepsie a augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$  dans les cardiomyocytes de  $1.5 \pm 0.2$  pA/pF à  $2.3 \pm 0.3$  pA/pF, soit une augmentation d'environ 1.5X. De plus, selon nos résultats, l'augmentation d' $I_{NaL}$  est générée par des canaux de types nNavs sensibles à 1 nM de TTX. Afin d'appuyer davantage nos résultats, il a été démontré dans un modèle de rat épileptique spontané que les niveaux d'expression de plusieurs canaux sodiques de type nNavs (Nav1.1, 1.2, 1.3 et 1.6) ainsi que la sous-unité  $\beta_1$  étaient surexprimés au niveau de l'hippocampe (Guo *et al.*, 2008, 2013; Xu *et al.*, 2013). Les auteurs font donc un parallèle entre l'augmentation d' $I_{Na}$  qu'ils ont observée et l'augmentation d'expression des canaux sodiques. D'après ces études et nos résultats, il paraît fort probable que l'augmentation d' $I_{NaL}$  que nous observons soit due à une surexpression de canaux sodiques de type nNavs. De plus, Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2013) ont observé des modifications de l'expression (sur et sous-expression) de la Calmoduline Kinase II (CaMKII) dans différentes parties du cerveau chez des rats épileptiques. Il a été démontré que la CaMKII augmentait l'amplitude d' $I_{NaL}$  et la DPA (Aiba *et al.*, 2010). Il se peut alors que l'augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  soit due à une augmentation de l'activité de la CaMKII par l'épilepsie. Ma *et al.* ont également démontré l'implication de la CaMKII et de la PKC dans la modulation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Ma *et al.*, 2012). Les auteurs ont montré qu'une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium entraînait une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  de façon concentration-dépendante dans des cardiomyocytes ventriculaires de lapin. Nos résultats montrent que l'activité de la PKC n'est pas modifiée en condition épileptique. En revanche, la PKA peut moduler l'activité de la PKC de façon indirecte. La phosphorylation des canaux calciques de type L par la PKA va déclencher leur ouverture et permettre aux ions calcium de passer à l'intérieur de la cellule. Cette augmentation intracellulaire en ions calcium a pour conséquence d'augmenter l'activité de la PKC et de la CaMKII qui peuvent augmenter l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Les observations faites au niveau neuronal présentes dans la littérature concordent et renforcent nos résultats obtenus au niveau

cardiaque. En effet, que ce soit à cause de mutations ou dans des modèles de rats épileptiques spontanés ou induit par injection de pilocarpine, l'épilepsie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Cette augmentation est probablement due à une augmentation du niveau d'expression de divers canaux sodiques de type nNavs. En effet, nos résultats montrent qu'après l'ajout d' 1 nM de TTX, les amplitudes d' $I_{NaL}$  sham et épileptique ne sont plus différentes. L'hypothèse d'une modification de la régulation du système nerveux autonome concorde également avec une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$ . La CaMKII augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ , tout comme la PKC qui peut en plus modifier le niveau d'expression de canaux sodiques. Enfin, les sous-unités  $\beta$  jouent un rôle majeur dans la modulation des propriétés biophysiques des canaux sodiques. Cependant, *in vivo*, leurs associations aux canaux sodiques peuvent être multiples. Selon le type d'association, elles peuvent à la fois augmenter/diminuer l'amplitude d' $I_{Na}$  ainsi que décaler positivement ou négativement les paramètres d'activation et d'inactivation des canaux sodiques.

L'épilepsie est responsable d'arythmies cardiaque (bradycardie, allongement de l'intervalle QT, bloc de conduction) pouvant être létales. L'augmentation d' $I_{NaL}$  peut donc entraîner une augmentation de la DPA ventriculaire et de la durée de la période réfractaire, et être à l'origine de l'allongement de l'intervalle QT. De plus, l'épilepsie décale les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$  vers des potentiels plus négatifs, ce qui signifie que le courant de fenêtre sodique est également décalé vers des potentiels plus négatifs (analyse non effectuée dans ce mémoire). Comme expliqué dans le projet sur les chiens IH, cela peut être à l'origine d'une dépolarisation du potentiel membranaire de repos et participer ainsi, associé à l'augmentation du temps de réactivation, à un ralentissement de la conduction cardiaque pouvant mener à l'apparition de BAV. Finalement, cette étude est la première à explorer les effets de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques au niveau cardiaque. Les modifications induites par l'épilepsie que nous avons observée corroborent avec l'apparition des troubles du rythme cardiaque présents chez les patients épileptiques. L'augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$ , la diminution de la disponibilité des Navs, l'augmentation du

temps de réactivation des NaVs ainsi que le décalage négatif du courant  $I_{Na,w}$  en condition épileptique semblent être à l'origine du développement des arythmies cardiaques pouvant mener aux MSIE.

#### 4.3.5 Troubles de conduction et épilepsie

Les crises d'épilepsie sont responsables d'un allongement de l'intervalle QT, mais également de l'apparition de BAV. L'allongement de l'intervalle QT semble donc provenir d'une augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  par l'intermédiaire d'une augmentation de la contribution des nNaVs. En revanche, les problèmes de conduction dépendent davantage de l'inactivation et de la réactivation des canaux sodiques. Nos résultats montrent que l'épilepsie a significativement diminué la disponibilité (décalage négatif) et augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques. Une diminution de la disponibilité associée à une augmentation du temps de réactivation sont des facteurs propices à l'apparition de troubles de conduction. En effet, suite à ces changements, les canaux sodiques sont moins disponibles et mettent davantage de temps à se réactiver. Cela a pour conséquence de ralentir la conduction cardiaque et dans des conditions plus extrêmes (crises) de déclencher un BAV. D'ailleurs, plusieurs rapports de médecins montrent que les crises d'épilepsie peuvent engendrer l'apparition de BAV (Altenmüller *et al.*, 2004; Hocker *et al.*, 2013), dont Ignatius Gerardo *et al.* qui font état d'un cas inhabituel concernant l'apparition d'un BAV complet chez une patiente en pleine crise (Zarraga et Ware, 2007). Afin d'expliquer cela, les auteurs rapportent qu'un dérèglement de la régulation du système nerveux autonome central lors des crises peut déclencher l'apparition de troubles du rythme ainsi que de BAV. Nos résultats montrent donc que l'épilepsie a faiblement (-3 mV), mais significativement diminué la disponibilité des canaux sodiques. Au niveau neuronal, des expériences *in-vitro* sur les mutations T875M (Alekov *et al.*, 2001) et W1204R (Lossin *et al.*, 2002) liées à l'épilepsie montrent une diminution de la disponibilité, tandis qu'*in vivo* l'épilepsie ne semble pas modifier la disponibilité (Agrawal *et al.*, 2003; Ellerkmann *et al.*, 2003). Cependant, au niveau cardiaque, plusieurs isoformes de canaux sodiques (NaV1.5 et nNaVs) ayant des propriétés

biophysiques différentes sont exprimées et une modification de l'expression de l'un d'eux pourrait expliquer ce décalage. Par la suite, nous avons montré que l'épilepsie a augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques. Le temps de récupération des canaux sodiques à partir des états inactivés est un paramètre critique dans la conduction cardiaque. Spampinato *et al.* ont montré *in vitro* que la mutation T875M associée à la sous-unité  $\beta 1$  augmentait le temps de réactivation (Spampinato *et al.*, 2001), tandis qu'*in vivo* l'épilepsie ne modifie pas le temps de réactivation (Ellerkmann *et al.*, 2003; Remy *et al.*, 2003). Encore une fois, et pour les raisons évoquées auparavant, il est difficile de comparer nos résultats obtenus au niveau cardiaque de ceux obtenus au niveau neuronal. Dans nos expériences, l'épilepsie a donc diminué la disponibilité et augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques ce qui coïncide avec l'apparition de bradycardie et de trouble de conduction (BAV) visible chez les patients épileptiques.

Nous avons également analysé l'effet de l'isoprotérénol afin de déterminer si la diminution de la disponibilité ainsi que l'augmentation du temps de réactivation des canaux sodiques étaient dues à une modification du tonus adrénergique. Tout d'abord, nos résultats montrent que l'effet maximum de l'isoprotérénol est similaire dans les deux groupes. En effet, lorsque l'on compare les données d'inactivation et de réactivation après traitement (10  $\mu$ M d'isoprotérénol), les valeurs entre les groupes sham et épileptiques ne sont plus statistiquement différentes et leur similitude est surprenante. La réponse adrénergique ne semble donc pas être modifiée ou altérée chez les animaux épileptiques. En revanche, nos résultats montrent que les courbes de réactivation des animaux épileptiques contrôle et traitée se superposent, ce qui nous indique que l'augmentation du temps de réactivation observée en épilepsie semble passer par la voie  $\beta$ -adrénergique et que celle-ci est déjà activée de façon constitutive. En effet, nos résultats montrent que tous les décalages induits par l'épilepsie vont dans le même sens que ceux induits par l'isoprotérénol, ce qui renforce le concept d'un état de dominance sympathique concernant les animaux épileptiques. La voie adrénergique faisant intervenir les protéines kinases A et C, nous avons également analysé l'effet d'un bloqueur de PKA et PKC sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques.

Concernant la PKC, nos résultats montrent que son inhibition par la chébérythrine ne modifie pas le temps de réactivation des canaux sodiques en conditions sham et épiléptique. L'augmentation du temps de réactivation observé chez les animaux épiléptiques ne semble donc pas être due à un changement dans l'activité de la PKC. En revanche, et contrairement aux contrôles, nos résultats montrent que l'inhibition de la PKC entraîne une diminution significative de la disponibilité. La diminution de la disponibilité en condition épiléptique peut donc provenir de la PKC. Watson *et al.* ont étudié les effets d'une activation de la PKC dans des cellules néonatales de ventricules de rats (Watson et Gold, 1997). Leurs résultats montrent que l'activation de la PKC a décalé la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs et que cet effet pouvait être inversé suite à l'application de chébérythrine. Les auteurs précisent également que l'application de chébérythrine seule ne modifiait pas la disponibilité des canaux sodiques. Ces résultats concordent avec les nôtres puisque pour les rats sham, l'inhibition de la PKC n'a pas modifié la disponibilité. En revanche, en condition épiléptique, la chébérythrine a significativement diminué la disponibilité des canaux sodiques. Les crises d'épilepsie sont souvent suivies de bradycardie ce qui signifie que le tonus vagal prédomine. Une stimulation vagale facilite la libération de PUFA (Das, 2011) dont le Palmitoyl-L-Carnitine qui est un inhibiteur endogène de la PKC. Cette inhibition temporaire de la PKC peut donc diminuer la disponibilité des canaux sodiques des personnes épiléptiques et ainsi contribuer au développement des BAV. De plus, Wu *et al.* ont montré que le Palmitoyl-L-Carnitine pouvait augmenter l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Wu *et al.*, 2009). Nos résultats montrent que l'épilepsie a augmenté l'amplitude d' $I_{NaL}$  de façon constitutive, car les animaux sacrifiés n'étaient pas en condition post-ictus. Ces résultats suggèrent donc que l'amplitude d' $I_{NaL}$  pourrait être davantage augmentée lors d'une stimulation vagale et contribuer également aux BAV. En revanche, lorsque l'on compare pour les conditions sham et épiléptiques, l'inhibition de la PKC n'a pas modifié les autres paramètres biophysiques des canaux sodiques : augmentation d' $I_{Na,max}$ , décalage négatif de la courbe  $m_{\infty}$  et aucun effets sur la réactivation des canaux sodiques. Au

vu de ces résultats, la PKC ne semble donc jouer qu'un rôle mineur dans le développement des arythmies cardiaques liées à l'épilepsie.

Au sujet de la PKA, nos résultats montrent que son inhibition a diminué la disponibilité et augmenté le temps de réactivation dans les conditions sham et épileptique. Ces modifications ont pour effet de ralentir la conduction cardiaque, ce qui corrobore avec les effets induits par une stimulation vagale. Shuai Liu *et al.* ont étudié les effets d'une activation de la PKA sur le gène SCN1A dans un modèle d'expression hétérologue (tsA201; Liu and Zheng, 2013). Leur résultats montrent qu'une activation de la PKA diminuait l'amplitude de  $I_{Na,max}$  et décalait négativement les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ . Dans nos conditions expérimentales et suite à l'inhibition de la PKA par le H-89, nous observons également un décalage négatif des courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ . La divergence entre nos résultats peut s'expliquer par les effets opposés d'une activation de la PKA sur les courants sodiques de type cardiaque (NaV1.5) et neuronaux (nNavs) puisque les cardiomyocytes expriment davantage de NaV1.5 que de nNavs. De plus, l'activité de la PKA peut également être diminuée par des protéines kinases inhibitrices (PKI) présentes de façon endogènes au niveau cardiaque. Les trois isoformes de PKI connues chez l'homme sont la PKI $\alpha$ , la PKI $\beta$  et PKI $\gamma$  qui est la forme la plus abondante au niveau cardiaque (Zheng *et al.*, 2000). La PKI peut être directement activée par l'AMPc qui vient se fixer sur le site catalytique (Ashby et Walsh, 1972). Chez les souris par exemple, le taux d'AMPc basal au niveau cardiaque est de 1.2  $\mu$ M (Iancu *et al.*, 2008). Ce taux basal d'AMPc est donc responsable d'une régulation basale de l'activité de la PKA et PKI par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase (producteurs d'AMPc) et de la phosphodiesterase (inhibe la production d'AMPc) (duBell *et al.*, 1996; Iancu *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2011). De plus, Cohen *et al.* ont montré que l'activité basale de la PKI était d'environ 30%, mais que celle-ci augmentait à 70% suite à une injection intraveineuse d'adrénaline chez le lapin (Aitken et Cohen, 1982; Foulkes et Cohen, 1979; Foulkes *et al.*, 1980). Les auteurs précisent que parallèlement à cette augmentation d'activité de la PKI, l'activité de la PKA diminuait. Nos résultats montrent que les rats épileptiques sont sous une faible dominance sympathique (hyposensibilité à l'isoprotérénol), ce qui pourrait conjointement conduire à une

diminution de l'activité de la PKA et à une augmentation de l'activité de la PKI. Pour une même concentration de H-89, nos résultats montrent que la disponibilité a davantage été réduite en condition épileptique et que le temps de réactivation a également été davantage diminué en condition épileptique. Cela peut donc s'expliquer par un effet cumulatif entre le H-89 et la présence d'une PKI intrinsèquement plus active en condition épileptique. De plus, les décalages négatifs des courbes  $m_\infty$  et  $h_\infty$ , ainsi que la diminution du temps de réactivation induits par l'épilepsie seule, vont dans le même sens que ceux induits par une inhibition de la PKA. Il se pourrait donc que la diminution de la disponibilité ainsi que la diminution du temps de réactivation en condition épileptique soient dues à une inhibition de la PKA suite à une augmentation de l'activité de la PKI. Ces modifications biophysiques du courant sodiques pourraient finalement participer à l'apparition de bradycardies (diminution de la conduction) et au développement de BAV.

Pour conclure, notre étude est donc la première à s'intéresser aux effets de l'épilepsie sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques au niveau cardiaque. Nos résultats montrent que l'épilepsie tend vers une augmentation de l'excitabilité cardiaque et une augmentation de l'amplitude de  $I_{NaL}$  par l'intermédiaire d'une plus forte contribution des nNaVs. L'augmentation de l'excitabilité cardiaque peut être comparée à l'hyperactivité neuronale présente chez les patients épileptiques. De plus, les expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'épilepsie augmentait l'amplitude de  $I_{NaL}$  en augmentant le niveau d'expression des nNaVs au niveau neuronal. Au regard de la littérature et de nos résultats, l'épilepsie semble donc modifier l'activité cardiaque de la même façon qu'elle affecte l'activité neuronale. Selon nos résultats, l'allongement de l'intervalle QT et le développement de BAV pouvant mener aux MSIE chez les patients épileptiques seraient principalement dû à une augmentation de l'amplitude de  $I_{NaL}$  au niveau cardiaque. Nos résultats montrent également que les animaux épileptiques semblent être sous dominance sympathique, ce qui coïncide avec les problèmes de régulation du système autonome. Nous avons par la suite analysé les effets d'une inhibition de la PKA et PKC sur le courant sodique cardiaque. Nos résultats

montrent que l'inhibition de la PKC a diminué la disponibilité uniquement en condition épileptique, et que l'inhibition de la PKA a diminué très fortement la disponibilité et a considérablement augmenté le temps de réactivation des canaux sodiques. Les crises sont caractérisées par des périodes de tachycardie suivies de bradycardie, et les BAV apparaissent en moyenne 30 minutes post-ictus. Additionné à l'augmentation d' $I_{NaL}$ , le mode de développement des BAV serait donc dû à une forte diminution de la disponibilité ainsi qu'à une augmentation conséquente du temps de réactivation des canaux sodiques lors de l'activation de la PKI sous tonus sympathique et de l'inhibition de la PKC sous tonus parasympathique. Il serait intéressant de développer un modèle animal présentant des cas de MSIE et de diminuer ou bloquer l'activité de la PKI qui est la forme la plus présente au niveau cardiaque. Gangolli *et al.* ont d'ailleurs généré par recombinaison homologe un modèle de souris déficientes en PKI (Gangolli *et al.*, 2000).

#### **4.4 Effet de l'ischémie sur les différentes composantes du courant sodique cardiaque**

Pour ce projet, nous avons utilisé un protocole d'ischémie permettant de simuler l'ischémie sur des cellules isolées. Nos résultats montrent que l'ischémie a diminué d'environ 32% l'amplitude du courant sodique sans aucune modification de l'activation, mais a décalé vers des potentiels plus négatifs la courbe de disponibilité. Ces résultats concordent avec la littérature qui recense également une diminution de l'amplitude d' $I_{Na}$ . Hu *et al.* ont montré au niveau de l'épicarde, du myocarde et de l'endocarde de lapin que l'ischémie diminuait l'amplitude d' $I_{Na}$  sans changer le  $V_{1/2}$  d'activation, mais que la courbe de disponibilité était décalée négativement (Hu *et al.*, 2003). Il est également connu que l'ischémie augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$  (Ju *et al.*, 1996; Hale *et al.*, 2006; Shryock et Belardinelli, 2008). Nos résultats montrent que l'ischémie a doublé voire triplé l'amplitude d' $I_{NaL}$  selon le potentiel membranaire appliqué. En fait, on pensait auparavant que l'augmentation de calcium intracellulaire était due à une augmentation de

l'amplitude du courant de fenêtre, entraînant l'apparition d'une composante dépolarisante soutenue pendant la phase de plateau du PA. Cependant, ce courant soutenu peut être mesuré à des potentiels membranaires très positifs situés en dehors de la région délimitée par le croisement des courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$ . La nature sodique de ce courant a été déterminée par sa sensibilité à la TTX. L'ischémie diminue donc le courant  $I_{Na, Max}$  mais étonnamment augmente l'amplitude d' $I_{NaL}$ . Plusieurs hypothèses ont émergé de ces observations. En effet, l'ischémie, de par ses nombreuses modifications et perturbations de la machinerie intracellulaire peut moduler l'expression et les propriétés biophysiques des canaux sodiques en modifiant leur état de phosphorylation (PKC, PKA) ou encore leur association aux différentes sous-unités  $\beta$ . Deux observations majeures ont cependant permis l'élaboration d'une seconde hypothèse. Premièrement, le courant soutenu peut être complètement bloqué par la TTX. Cette observation a donc permis de déterminer que ce courant était généré par des canaux de type sodique. Deuxièmement, des expériences ont montré que l'utilisation d'un potentiel membranaire de maintien de -50 mV permettait de 'supprimer' le courant sodique pic, mais que la composante soutenue était toujours activable. La composante soutenue semble donc être générée par d'autres types de canaux sodiques possédant des propriétés biophysiques différentes de NaV1.5 et plus précisément au niveau de leur disponibilité. Notre laboratoire a détecté la présence de canaux sodiques de types neuronaux au niveau cardiaque et nous avons remarqué que le niveau d'expression des nNaVs était plus important dans les tissus impliqués dans la conduction de l'influx électrique (Haufe *et al.*, 2005a). Les nNaVs semblent donc être impliqués dans la transmission du PA cardiaque. Cependant, les cardiomyocytes ventriculaires expriment également des nNaVs et nous avons voulu déterminer si l'augmentation de l'amplitude d' $I_{NaL}$  induite par l'ischémie au sein de ces cardiomyocytes était due à un possible remodelage au niveau de l'expression des différentes isoformes de canaux sodiques. Nous avons pour cela utilisé le MTSEA qui est un bloqueur sélectif de NaV1.5. Le MTSEA forme un pont disulfure avec la cystéine 372 qui est absente au niveau des nNaVs et bloque de façon covalente le canal sodique type cardiaque. Nos résultats montrent que le

MTSEA bloque environ 90% d' $I_{Na, Max}$  en condition contrôle et ischémique. Le courant MTSEA insensible (généralisé par les nNaVs) représente donc 10% d' $I_{Na, Max}$  pour les deux conditions. Selon nos résultats, l'ischémie n'a pas modifié le ratio nNaVs/NaV1.5 participant au courant sodique pic. L'application de MTSEA nous a permis d'analyser l'activation et l'inactivation des canaux sodiques MTSEA-insensibles (nNaVs) en condition contrôle et ischémique. Nos résultats montrent que les courbes  $m_{\infty}$  et  $h_{\infty}$  en présence de 2 mM de MTSEA ne sont pas différentes. Ces résultats nous indiquent que l'ischémie n'a pas modifié l'activation et l'inactivation des nNaVs et que la diminution de la disponibilité induite par l'ischémie (sham vs ischémie) concerne donc les canaux sodiques de type NaV1.5. En résumé, nos résultats nous indiquent que l'ischémie ne modifie pas le niveau de participation des différents types de canaux sodiques à  $I_{Na, Max}$ , mais diminue la disponibilité des canaux sodiques de type cardiaque. Cependant, il est important de noter que les nNaVs participent davantage à  $I_{NaL}$  qu'au courant  $I_{Na, Max}$ . En effet, nous avons démontré que les nNaVs étaient responsables d'environ 50% du courant soutenu (Biet *et al.*, 2012). Une augmentation de l'expression des nNaVs aura donc un impact plus important sur  $I_{NaL}$  que sur  $I_{Na}$  pic. Nos résultats montrent que contrairement aux contrôles,  $I_{NaL}$  était entièrement bloqué par 25  $\mu$ M de TTX en condition ischémique. Afin de déterminer l'origine de cette différence, nous avons utilisé diverses concentrations de TTX dans le but de discriminer les canaux sodiques sensibles à de faibles concentrations de TTX (nNaVs, nM) des résistants (NaV1.5,  $\mu$ M). Nos résultats préliminaires nous montrent deux choses importantes. Premièrement, la courbe I/V d' $I_{NaL}$  contrôle présente deux pics (à -30 mV et à 0 mV), tandis qu'un seul pic semble être présent en condition ischémique (0 mV). Deuxièmement, dans les deux conditions, le pic à 0 mV présente une sensibilité à de faibles concentrations de TTX. Pour rappel, le pic de courant des canaux NaV1.5 se situe aux alentours de -30 mV, alors que celui des nNaVs est compris entre 0 et +10 mV. Nos résultats concordent fortement avec la répartition des différents types de canaux selon leur pic de courant, mais aussi selon leur sensibilité à la TTX. En effet, le pic à -30 mV en condition contrôle (correspondant plutôt à un point d'inflexion) n'est pas sensible à de faibles concentrations de TTX

et est uniquement bloqué en partie par 1  $\mu\text{M}$  de TTX. En revanche, le pic contrôle à 0 mV est partiellement bloqué par 1 et 3 nM de TTX, et davantage par 1  $\mu\text{M}$ . Cependant, en condition ischémique, nos résultats (très) préliminaires montrent que le courant  $I_{\text{NaL}}$  ne possède qu'un seul pic à 0 mV et que celui s'avère être très sensible à la TTX puisqu'il est totalement bloqué par 3 nM de TTX. Ces résultats concordent avec nos résultats précédents sur l'amplitude totale d' $I_{\text{NaL}}$ . En effet, en condition contrôle, nos résultats montraient que le courant total  $I_{\text{NaL}}$  n'était pas entièrement bloqué par 25  $\mu\text{M}$  de TTX alors qu'en condition ischémique la totalité du courant était bloquée. Cette différence de sensibilité à la TTX d' $I_{\text{NaL}}$  en condition ischémique semble donc provenir de la nature des canaux sodiques qui le génèrent. Les nNavs semblent être les seuls contributeurs d' $I_{\text{NaL}}$  en condition ischémique. Comme les nNavs possèdent une composante soutenue de plus grande amplitude que NaV1.5, cela pourrait expliquer l'augmentation d'amplitude d' $I_{\text{NaL}}$  observée en condition ischémique. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si les nNavs sont surexprimés en condition ischémique. En effet, l'ischémie semble 'enlever' la composante soutenue normalement générée par les canaux sodiques de type NaV1.5 en diminuant par les différentes possibilités énumérées ci-dessus (phosphorylation, sous-unités  $\beta$ ) la disponibilité et possiblement en accélérant l'inactivation. De part ce fait, seuls les canaux sodiques de types neuronaux dont la disponibilité ne semble pas être affectée en condition ischémique (courbe  $h_{\infty}$  ischémique + MTSEA) seraient responsables d' $I_{\text{NaL}}$  en condition ischémique. Ces résultats concordent avec les données présentes dans la littérature montrant des effets bénéfiques de la ranolazine (bloqueur d' $I_{\text{NaL}}$ ) après un épisode ischémique (Belardinelli *et al.*, 2006; Hale et Kloner, 2006; Hale *et al.*, 2006; Shryock et Belardinelli, 2008; Soliman *et al.*, 2012). En effet, l'ischémie entraîne une surcharge intracellulaire en ions calcium. Cette surcharge dépend et est précédée par une surcharge en ion sodium (Haigney *et al.*, 1994). Bloquer l'entrée d'ions sodium peut donc permettre de limiter l'entrée d'ions calcium à l'intérieur de la cellule. Cela pourra donc permettre de limiter les effets des différents échangeurs sur la modulation des concentrations

ioniques de part et d'autre de la membrane et par conséquent de limiter l'apparition d'arythmies liées à l'ischémie.

## Perspectives & Conclusion Générale

Nous avons démontré qu'une exposition aiguë d'AG libres entraînait des modifications du courant sodique cardiaque compatibles avec le développement des cardiomyopathies diabétiques. Il serait alors intéressant de déterminer les effets d'une exposition chronique d'AG libres (toujours chez le chien) et de voir si celle-ci entraîne l'apparition de cardiomyopathie. Il serait également intéressant d'analyser les effets de cette augmentation d'acides gras libres sur d'autres types de courants ioniques cardiaque tels que les différents courants potassiques mais aussi d'effectuer des mesures de PA. La mesure de PA pourra en effet nous permettre de confirmer l'augmentation de l'excitabilité cardiaque liée au décalage négatif de la courbe IV du courant sodique cardiaque et déterminer si l'augmentation de l'amplitude du courant de fenêtre sodique ( $I_{Na, w}$ ) entraîne une prolongation de la DPA.

Nos résultats montrent qu'une exposition *in-utero* à la nicotine modifie les paramètres biophysiques du courant sodique cardiaque de la même façon qu'une stimulation adrénergique. De plus, nos résultats montrent qu'une exposition *in-utero* à la nicotine abolit les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur le courant sodique cardiaque et serait responsable d'une dominance sympathique chez les lapereaux exposés. Il serait donc intéressant d'effectuer plusieurs autres mesures et expériences afin d'appuyer nos résultats. L'hypothèse d'une dominance sympathique pourrait être étayée par un dosage du taux d'adrénaline circulant chez les lapereaux et par une quantification des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. D'après nos résultats, l'exposition *in-utero* à la nicotine augmenterait le taux

d'adrénaline et entraînerait une saturation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques conduisant dans un premier temps à une surexpression de ces derniers puis à leur désensibilisation. Enfin, il serait également intéressant d'effectuer des tests in-vivo à l'isoprotérénol et d'enregistrer en parallèle des tracés d'ECG. Si la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est bien présente, on ne devrait pas observer d'accélération du rythme cardiaque chez les lapereaux exposés. Cette absence d'accélération du rythme cardiaque, si avérée, pourrait être mise en parallèle avec l'absence de réflexe d'AR chez les enfants exposés *in-utero* à la nicotine. Cela supporterait donc l'hypothèse selon laquelle l'origine du SMSN viendrait d'un problème cardiaque (et plus précisément d'une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) plutôt que des centres respiratoires.

D'après nos résultats, l'épilepsie semble comme au niveau neuronal entraîner un remodelage ionique au niveau cardiaque en sur-exprimant des canaux sodiques sensibles à de très faibles concentrations de TTX (nNaVs). Nos résultats montrent que l'épilepsie augmente le taux de participation des nNaVs à  $I_{NaL}$  au niveau cardiaque. Ce phénomène pourrait donc participer à l'allongement de l'intervalle QT observé chez les patients épileptiques. S'agissant ici de la première étude portant sur les effets de l'épilepsie au niveau cardiaque, les perspectives envisageables peuvent être très nombreuses, c'est pourquoi j'énumérerai que certaines d'entre elles. Les premières expériences complémentaires à faire seraient de déterminer par buvardage de type western, les niveaux d'expression des différents isotopes de canaux sodiques (TTX-R et TTX-S) à savoir NaV 1.5, 1.1, 1.2, 1.3 et 1.6. D'après nos résultats, nous nous attendons à observer une augmentation du niveau d'expression des nNaVs. Il serait également extrêmement intéressant d'effectuer des enregistrements d'ECG afin de déterminer si l'épilepsie prolonge la durée de l'intervalle QT et d'appliquer de la ranolazine (bloqueurs spécifique d' $I_{NaL}$ ). Selon nos résultats, l'application de ranolazine devrait davantage réduire la durée de l'intervalle QT chez les animaux épileptiques comparativement aux animaux sham. Nos résultats montrent également que l'épilepsie semble modifier le tonus sympatho-vagal en faveur d'une dominance sympathique mais sans toutefois entraîner une désensibilisation

des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Des mesures d' $I_{NaL}$  en présence d'isoprotérénol, de chébérythrine et de H-89 pourraient s'avérer pertinentes afin d'analyser l'évolution de l'amplitude d' $I_{NaL}$  au cours des différentes phases d'une crise d'épilepsie.

L'ischémie cardiaque est responsable de l'apparition de troubles du rythme tels que des QT long, tachycardies ventriculaires, torsades de pointes, de phénomène de réentrées et d'une dépolarisation du potentiel membranaire. Nos résultats montrent que l'ischémie entraîne sur des cardiomyocytes du ventricule gauche du chien une diminution d' $I_{Na, Max}$  et une augmentation d' $I_{NaL}$  et que cette augmentation d' $I_{NaL}$  serait générée, d'après nos résultats préliminaires, par des canaux sodiques TTX-s (nNaVs). Tout comme le projet portant sur l'épilepsie, il serait intéressant de déterminer par buvardage de type western, les niveaux d'expression des différents isotypes de canaux sodiques (NaV 1.5, 1.1, 1.2, 1.3 et 1.6). On pourrait également effectuer des mesures de PA afin de déterminer si l'augmentation d' $I_{NaL}$  en condition ischémique entraîne une prolongation de la DPA. Enfin, il est bon de préciser que notre modèle expérimental présente des limites puisque nous avons simulé l'ischémie sur des cardiomyocytes isolés. Il serait en effet très utile d'étudier les effets d'une ischémie au niveau cardiaque sur un animal. Cela nous permettrait alors d'effectuer des enregistrements d'ECG et de déterminer si l'ischémie entraîne effectivement une prolongation de l'intervalle QT et si l'utilisation de ranolazine par exemple diminue davantage la durée de cet intervalle comparativement aux animaux contrôles.

Le courant sodique cardiaque joue un rôle prépondérant dans l'excitabilité et la conduction de l'influx électrique cardiaque et est responsable de la phase de dépolarisation membranaire. Une altération de ces propriétés biophysiques peut donc entraîner l'apparition d'arythmies cardiaques pouvant parfois être létales. Au cours de cette thèse, nous avons analysés les effets de différents modèles physiopathologiques (perfusion d'acides gras libres, exposition *in-utero* à la nicotine, l'épilepsie et l'ischémie) connus pour être responsables d'arythmies

cardiaques afin d'étudier leur impact sur le courant sodique. Nos résultats montrent que ces pathologies ont toutes altéré les propriétés électrophysiologiques du courant sodique cardiaque et ce de différentes façons et que ces altérations concordent avec les types d'arythmies observées. Selon nos résultats, la perfusion d'AG libres ainsi que l'exposition *in-utero* à la nicotine modifient les propriétés biophysiques du courant sodiques respectivement en modifiant le contenu lipidique de la membrane plasmique et/ou suite à une interaction directe entre les AG perfusés et les canaux sodiques, et en désensibilisant les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. L'épilepsie et l'ischémie semblent quant à eux entraîner un remodelage ionique en augmentant le niveau d'expression de canaux sodiques de type neuronal (TTX-s). Cette surexpression de nNavs se traduit par une augmentation de l'amplitude de  $I_{NaL}$  qui présente, dans ces deux modèles, une plus grande sensibilité à de faibles concentrations de TTX. Ce remodelage ionique induit par ces deux modèles expérimentaux concorde avec les observations cliniques montrant un allongement de la durée de l'intervalle QT. Néanmoins, la durée des PA cardiaques est la résultante d'un équilibre provenant de plusieurs types de courants ioniques ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ ) et il peut exister des phénomènes de compensation lorsqu'un des types de courant est altéré. C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier l'impact des ces pathologies sur ces autres courants afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le but de développer de futurs approches thérapeutiques.

	IH	Nicotine	Épilepsie	Ischémie
$I_{Na,Max}$	↑	↑	↑	↓
$m_{\infty}$	←	←	←	=
$h_{\infty}$	←	←	←	←
Réactivation	=	-	↑	-
$I_{Na,w}$	↑ ; ←	-	-	-
$I_{NaL}$	-	-	↑	↑
Iso	-	X	↓	-
Chélé	-	-	↑	-
H-89	-	-	↓	-

**Tableau 6 Résumé des effets des différentes conditions physiopathologiques sur les paramètres biophysiques du courant sodique.**

- ↑ : Augmentation
- ↓ : Diminution
- ← : Décalage négatif
- = : Aucune modification
- X : Abolit l'effet
- : Paramètre non mesuré

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les professeurs Mohamed CHAHINE, Danielle JACQUES et Paul PAPE pour avoir accepté d'être président et rapporteurs du jury de ma thèse.

Je souhaite bien évidemment remercier tous les membres du laboratoire ainsi que tous les stagiaires qui ont participé à la bonne ambiance générale durant toute ma thèse. Je tiens à remercier très chaleureusement les assistants de recherche Jean-François Delabre et Nathalie Morin pour leur bonne humeur, leur disponibilité, leur soutien, leur aide ainsi que leurs nombreux et précieux conseils qu'ils ont su me donner tout au long de mon parcours. Je tiens également à remercier Ahn-Tuan Ton qui fut plus qu'un collègue de travail, mais un véritable ami sur qui j'ai pu compter à diverses reprises lorsque j'avais besoin d'aide. De plus, il m'a permis d'apprendre, comme tous les autres membres du laboratoire, les subtilités de la langue québécoise, ainsi que les faux amis existant entre nos deux 'Français' !

Je souhaite remercier tous les membres de l'animalerie centrale pour leur excellent travail, leur sympathie, leur bonne humeur et leur disponibilité. Ils ont toujours su répondre présents, malgré les quelques contretemps que je leur ai parfois imposés.

Je tiens aussi à remercier Mr Jean LAINÉ pour sa disponibilité, sa joie de vivre et pour les nombreuses fois où il m'a aidé à résoudre plusieurs problèmes techniques et matériels.

Je tiens à saluer toutes les personnes que j'ai rencontré au Québec et qui ont fait et feront de mon séjour ici, une expérience et un souvenir inoubliable. Je pense à : Fred, Ben, Toun, Le 'Stouff', Foued, les deux Dom, Vince, Seb, Fab, les deux David, Simon, Arno, Martin, Pascal, Myriam, Sonia, Marie, Laetitia, Julie et Mélanie ainsi que tous les Mayabang pour ces soirées poker, consoles, barbecue et sorties parfois bien arrosées! Je salue également tous les coéquipiers des

différentes équipes de soccer intramuros et l'équipe de Volley composée de Fred, Ben, Jeff, Myriam et Gen.

Je remercie tout particulièrement mes parents, mon frère ainsi que toute ma famille de m'avoir, malgré la distance, sans cesse soutenu et encourager dans l'entreprise de cette aventure. Je pense également à tous mes amis de France pour leur amitié sans faille et ceux qui sont maintenant mariés et même parents !

Mes derniers remerciements, non pas les moindres, vont à mon directeur de recherche Robert Dumaine sans qui je n'aurais jamais pu mener à bien ma thèse. Je te remercie sincèrement pour ta jovialité, tes nombreux conseils, ta disponibilité, mais également pour tes exigences en matière de qualité des résultats. Je pense tout particulièrement aux fameux six points nécessaires sur les courbes I/V pour atteindre le pic de courant ! Ces directives m'ont permis de développer mon esprit critique par rapport à la littérature, mais surtout par rapport à mes propres résultats. Cette exigence permanente a énormément contribué à mon apprentissage et à ma façon de travailler. Finalement je ne pouvais pas finir ces remerciements sans une petite anecdote qui me faisait dire que venir ici était un bon choix ! En effet, quelques mois à peine après être arrivé, je me retrouvais chez mon 'Boss', imbibé de téquila en train de jouer à 'Guitar Hero' avec l'équipe du laboratoire et surtout Hector, notre Mexicain national, qui chantait 'La Bamba' ! Pour tout ça, j'espère qu'à l'avenir nos routes se recroiseront.

## Liste des références

- Agrawal, N., Alonso, A., and Ragsdale, D.S. (2003). Increased persistent sodium currents in rat entorhinal cortex layer V neurons in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* *44*, 1601–1604.
- Aiba, T., Hesketh, G.G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M.C., O'Rourke, B., Akar, F.G., and Tomaselli, G.F. (2010). Na<sup>+</sup> channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* *85*, 454–463.
- Aitken, A., and Cohen, P. (1982). Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* *147*, 54–58.
- Akalin, F., Tirtir, A., and Yilmaz, Y. (2003). Increased QT dispersion in epileptic children. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* *1992* *92*, 916–920.
- Alekov, A., Rahman, M.M., Mitrovic, N., Lehmann-Horn, F., and Lerche, H. (2000). A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J. Physiol.* *529 Pt 3*, 533–539.
- Alekov, A.K., Rahman, M.M., Mitrovic, N., Lehmann-Horn, F., and Lerche, H. (2001). Enhanced inactivation and acceleration of activation of the sodium channel associated with epilepsy in man. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 2171–2176.
- Altenmüller, D.-M., Zehender, M., and Schulze-Bonhage, A. (2004). High-grade atrioventricular block triggered by spontaneous and stimulation-induced epileptic activity in the left temporal lobe. *Epilepsia* *45*, 1640–1644.
- Ansakorpi, H., Korpelainen, J.T., Suominen, K., Tolonen, U., Myllylä, V.V., and Isojärvi, J.I. (2000). Interictal cardiovascular autonomic responses in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* *41*, 42–47.
- Antzelevitch, C. (2006). Brugada syndrome. *Pacing Clin. Electrophysiol. PACE* *29*, 1130–1159.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., LeMarec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A.R., et al. (2005). Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* *111*, 659–670.
- Ashby, C.D., and Walsh, D.A. (1972). Characterization of the interaction of a protein inhibitor with adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. I. Interaction with the catalytic subunit of the protein kinase. *J. Biol. Chem.* *247*, 6637–6642.

- Ashpole, N.M., Herren, A.W., Ginsburg, K.S., Brogan, J.D., Johnson, D.E., Cummins, T.R., Bers, D.M., and Hudmon, A. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* *287*, 19856–19869.
- Belardinelli, L., Shryock, J.C., and Fraser, H. (2006). Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart Br. Card. Soc.* *92 Suppl 4*, iv6–iv14.
- Belardinelli, L., Liu, G., Smith-Maxwell, C., Wang, W.-Q., El-Bizri, N., Hirakawa, R., Karpinski, S., Li, C.H., Hu, L., Li, X.-J., et al. (2013). A novel, potent, and selective inhibitor of cardiac late sodium current suppresses experimental arrhythmias. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *344*, 23–32.
- Belke, D.D., and Dillmann, W.H. (2004). Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Curr. Hypertens. Rep.* *6*, 424–429.
- Belke, D.D., Swanson, E.A., and Dillmann, W.H. (2004). Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes* *53*, 3201–3208.
- Benowitz, N.L., Kuyt, F., and Jacob, P., 3rd (1984). Influence of nicotine on cardiovascular and hormonal effects of cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* *36*, 74–81.
- Benowitz, N.L., Hansson, A., and Jacob, P., 3rd (2002). Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking. *Hypertension* *39*, 1107–1112.
- Berendt, F.J., Park, K.-S., and Trimmer, J.S. (2010). Multisite phosphorylation of voltage-gated sodium channel alpha subunits from rat brain. *J. Proteome Res.* *9*, 1976–1984.
- Biet, M., Barajas-Martínez, H., Ton, A.-T., Delabre, J.-F., Morin, N., and Dumaine, R. (2012). About half of the late sodium current in cardiac myocytes from dog ventricle is due to non-cardiac-type Na(+) channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *53*, 593–598.
- Boland, L.M., and Drzewiecki, M.M. (2008). Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. *Cell Biochem. Biophys.* *52*, 59–84.
- Boudina, S., and Abel, E.D. (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* *115*, 3213–3223.
- Bracken, N., Howarth, F.C., and Singh, J. (2006). Effects of streptozotocin-induced diabetes on contraction and calcium transport in rat ventricular cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1084*, 208–222.
- Carpentier, A.C. (2008). Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* *34*, 97–107.

- Casis, O., Gallego, M., Iriarte, M., and Sánchez-Chapula, J.A. (2000). Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia* 43, 101–109.
- Chen, S., Su, H., Yue, C., Remy, S., Royeck, M., Sochivko, D., Opitz, T., Beck, H., and Yaari, Y. (2011). An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J. Neurophysiol.* 105, 117–129.
- Chiang, C.E., and Roden, D.M. (2000). The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1–12.
- Chiu, J.D., Kolka, C.M., Richey, J.M., Harrison, L.N., Zuniga, E., Kirkman, E.L., and Bergman, R.N. (2009). Experimental hyperlipidemia dramatically reduces access of insulin to canine skeletal muscle. *Obes. Silver Spring Md* 17, 1486–1492.
- Christidis, D., Kalogerakis, D., Chan, T.Y., Mauri, D., Alexiou, G., and Terzoudi, A. (2006). Is primidone the drug of choice for epileptic patients with QT-prolongation? A comprehensive analysis of literature. *Seizure J. Br. Epilepsy Assoc.* 15, 64–66.
- Chu, C.A., Sherck, S.M., Igawa, K., Sindelar, D.K., Neal, D.W., Emshwiller, M., and Cherrington, A.D. (2002). Effects of free fatty acids on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in conscious dogs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E402–411.
- Cook, C.B., Tsui, C., Ziemer, D.C., Naylor, D.B., Miller, W.J., and Hentz, J.G. (2006). Common reasons for hospitalization in urban diabetes patients. *Ethn. Dis.* 16, 391–397.
- Cook, C.B., Hentz, J.G., Miller, W.J., Tsui, C., Naylor, D.B., Ziemer, D.C., and Waller, L.A. (2007). Relationship of diabetes with cardiovascular disease-related hospitalization rates, length of stay, and charges: analysis by race/ethnicity, age, and sex. *Ethn. Dis.* 17, 714–720.
- Coraboeuf, E., Deroubaix, E., and Coulombe, A. (1979). Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am. J. Physiol.* 236, H561–567.
- Cordeiro, J.M., Greene, L., Heilmann, C., Antzelevitch, D., and Antzelevitch, C. (2004). Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1471–1479.
- Cossette, P., Loukas, A., Lafrenière, R.G., Rochefort, D., Harvey-Girard, E., Ragsdale, D.S., Dunn, R.J., and Rouleau, G.A. (2003). Functional characterization of the D188V mutation in neuronal voltage-gated sodium channel causing generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS). *Epilepsy Res.* 53, 107–117.
- Das, U.N. (2011). Vagal nerve stimulation in prevention and management of coronary heart disease. *World J. Cardiol.* 3, 105–110.

- Dasheiff, R.M. (1991). Sudden unexpected death in epilepsy: a series from an epilepsy surgery program and speculation on the relationship to sudden cardiac death. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* 8, 216–222.
- Dasheiff, R.M., and Dickinson, L.J. (1986). Sudden unexpected death of epileptic patient due to cardiac arrhythmia after seizure. *Arch. Neurol.* 43, 194–196.
- Devinsky, O., Perrine, K., and Theodore, W.H. (1994). Interictal autonomic nervous system function in patients with epilepsy. *Epilepsia* 35, 199–204.
- Dhalla, N.S., Panagia, V., Makino, N., and Beamish, R.E. (1988). Sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange and Ca<sup>2+</sup>-pump activities in cardiomyopathies due to intracellular Ca<sup>2+</sup>-overload. *Mol. Cell. Biochem.* 82, 75–79.
- duBell, W.H., Lederer, W.J., and Rogers, T.B. (1996). Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 493 ( Pt 3), 793–800.
- Dumaine, R., and Antzelevitch, C. (2002). Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* 17, 36–42.
- Dumaine, R., and Cordeiro, J.M. (2007). Comparison of K<sup>+</sup> currents in cardiac Purkinje cells isolated from rabbit and dog. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 378–389.
- Ellerkmann, R.K., Remy, S., Chen, J., Sochivko, D., Elger, C.E., Urban, B.W., Becker, A., and Beck, H. (2003). Molecular and functional changes in voltage-dependent Na<sup>(+)</sup> channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience* 119, 323–333.
- England, S., Bevan, S., and Docherty, R.J. (1996). PGE<sub>2</sub> modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.* 495 ( Pt 2), 429–440.
- Ergul, Y., Ekici, B., Tatli, B., Nisli, K., and Ozmen, M. (2013). QT and P wave dispersion and heart rate variability in patients with Dravet syndrome. *Acta Neurol. Belg.* 113, 161–166.
- Escayg, A., Heils, A., MacDonald, B.T., Haug, K., Sander, T., and Meisler, M.H. (2001). A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 866–873.
- Everett-Grueter, C., Edgerton, D.S., Donahue, E.P., Vaughan, S., Chu, C.A., Sindelar, D.K., and Cherrington, A.D. (2006). The effect of an acute elevation of NEFA concentrations on glucagon-stimulated hepatic glucose output. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E449–459.
- Fein, F.S., and Sonnenblick, E.H. (1994). Diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 8, 65–73.

- Fein, F.S., Kornstein, L.B., Strobeck, J.E., Capasso, J.M., and Sonnenblick, E.H. (1980). Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.* *47*, 922–933.
- Foulkes, J.G., and Cohen, P. (1979). The hormonal control of glycogen metabolism. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to adrenaline. *Eur. J. Biochem. FEBS* *97*, 251–256.
- Foulkes, J.G., Jefferson, L.S., and Cohen, P. (1980). The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin. *FEBS Lett.* *112*, 21–24.
- Fredersdorf, S., Thumann, C., Zimmermann, W.H., Vetter, R., Graf, T., Luchner, A., Riegger, G.A., Schunkert, H., Eschenhagen, T., and Weil, J. (2012). Increased myocardial SERCA expression in early type 2 diabetes mellitus is insulin dependent: In vivo and in vitro data. *Cardiovasc. Diabetol.* *11*, 57.
- French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J., and Gage, P.W. (1990). A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* *95*, 1139–1157.
- Frohnwieser, B., Chen, L.Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R.G. (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J. Physiol.* *498 (Pt 2)*, 309–318.
- Gangolli, E.A., Belyamani, M., Muchinsky, S., Narula, A., Burton, K.A., McKnight, G.S., Uhler, M.D., and Idzerda, R.L. (2000). Deficient gene expression in protein kinase inhibitor alpha Null mutant mice. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3442–3448.
- Gintant, G.A. (1995). Regional differences in IK density in canine left ventricle: role of IK<sub>s</sub> in electrical heterogeneity. *Am. J. Physiol.* *268*, H604–613.
- Gold, M.S., Reichling, D.B., Shuster, M.J., and Levine, J.D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1108–1112.
- Guo, F., Yu, N., Cai, J.-Q., Quinn, T., Zong, Z.-H., Zeng, Y.-J., and Hao, L.-Y. (2008). Voltage-gated sodium channel Nav1.1, Nav1.3 and beta1 subunit were up-regulated in the hippocampus of spontaneously epileptic rat. *Brain Res. Bull.* *75*, 179–187.
- Guo, F., Xu, X., Cai, J., Hu, H., Sun, W., He, G., Shao, D., Wang, L., Chen, T., Shaw, C., et al. (2013). The up-regulation of voltage-gated sodium channels subtypes coincides with an increased sodium current in hippocampal neuronal culture model. *Neurochem. Int.* *62*, 287–295.
- Haglund, B., and Cnattingius, S. (1990). Cigarette smoking as a risk factor for sudden infant death syndrome: a population-based study. *Am. J. Public Health* *80*, 29–32.

- Haigney, M.C., Lakatta, E.G., Stern, M.D., and Silverman, H.S. (1994). Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation* *90*, 391–399.
- Hakki, A., Pennypacker, K., Eidizadeh, S., Friedman, H., and Pross, S. (2001). Nicotine inhibition of apoptosis in murine immune cells. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *226*, 947–953.
- Hale, S.L., and Kloner, R.A. (2006). Ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel current, reduces postischemic myocardial dysfunction in the rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *11*, 249–255.
- Hale, S.L., Leeka, J.A., and Kloner, R.A. (2006). Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 418–423.
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P.C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D.W., Wells, K.S., Zhou, J., Yi, J., and Murray, K.T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc. Res.* *72*, 250–261.
- Hallaq, H., Wang, D.W., Kunic, J.D., George, A.L., Jr, Wells, K.S., and Murray, K.T. (2012). Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na<sup>+</sup> channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H782–789.
- Hammarström, A.K.M., and Gage, P.W. (2002). Hypoxia and persistent sodium current. *Eur. Biophys. J.* *EBJ 31*, 323–330.
- Haufe, V., Camacho, J.A., Dumaine, R., Günther, B., Bollensdorff, C., von Banchet, G.S., Benndorf, K., and Zimmer, T. (2005a). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in the developing mouse heart. *J. Physiol.* *564*, 683–696.
- Haufe, V., Cordeiro, J.M., Zimmer, T., Wu, Y.S., Schiccitano, S., Benndorf, K., and Dumaine, R. (2005b). Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I<sub>Na</sub> is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovasc. Res.* *65*, 117–127.
- Hayden, J.M., and Reaven, P.D. (2000). Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr. Opin. Lipidol.* *11*, 519–528.
- Hille, B., Woodhull, A.M., and Shapiro, B.I. (1975). Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *270*, 301–318.
- Hobai, I.A., and O'Rourke, B. (2000). Enhanced Ca<sup>2+</sup>-activated Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ. Res.* *87*, 690–698.
- Hocker, S., Prasad, A., and Rabinstein, A.A. (2013). Cardiac injury in refractory status epilepticus. *Epilepsia* *54*, 518–522.

- HODGKIN, A.L., and HUXLEY, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* *117*, 500–544.
- Hu, L., He, Z., Cui, J., Qi, S., and Yang, L. (2003). [Effect of simulated ischemia on activity and heterogeneity of Na<sup>+</sup> channel in rabbit ventricular epicardial, midmyocardial and endocardial myocytes]. *1 Jun Yi Xue Xue Bao Acad. J. First Med. Coll. PLA* *23*, 1293–1296, 1300.
- Huang, B., El-Sherif, T., Gidh-Jain, M., Qin, D., and El-Sherif, N. (2001). Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *12*, 218–225.
- Huang, Z.-G., Griffioen, K.J.S., Wang, X., Dergacheva, O., Kamendi, H., Gorini, C., Bouairi, E., and Mendelowitz, D. (2006). Differential control of central cardiorespiratory interactions by hypercapnia and the effect of prenatal nicotine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 21–29.
- Hunt, C.E., and Hauck, F.R. (2006). Sudden infant death syndrome. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *174*, 1861–1869.
- Iancu, R.V., Ramamurthy, G., Warriar, S., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Jones, S.W., and Harvey, R.D. (2008). Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C414–422.
- Isojärvi, J.I., Ansakorpi, H., Suominen, K., Tolonen, U., Repo, M., and Myllylä, V.V. (1998). Interictal cardiovascular autonomic responses in patients with epilepsy. *Epilepsia* *39*, 420–426.
- Jeon, J.H., Her, S.H., Chin, J.Y., Park, K.H., Yoon, H.J., Lee, J.M., and Jin, S.W. (2011). Complete atrioventricular block-induced Torsade de pointes, manifested by epilepsy. *Korean J. Intern. Med.* *26*, 99–102.
- Ju, Y.K., Saint, D.A., and Gage, P.W. (1996). Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* *497 (Pt 2)*, 337–347.
- Kahlig, K.M., Misra, S.N., and George, A.L., Jr (2006). Impaired inactivation gate stabilization predicts increased persistent current for an epilepsy-associated SCN1A mutation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10958–10966.
- Kang, J.X., and Leaf, A. (1996). Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na<sup>+</sup> channels by directly binding to the channel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3542–3546.
- Kenigsberg, D.N., Khanal, S., Kowalski, M., and Krishnan, S.C. (2007). Prolongation of the QTc interval is seen uniformly during early transmural ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 1299–1305.

- Kim, S.P., Catalano, K.J., Hsu, I.R., Chiu, J.D., Richey, J.M., and Bergman, R.N. (2007). Nocturnal free fatty acids are uniquely elevated in the longitudinal development of diet-induced insulin resistance and hyperinsulinemia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *292*, E1590–1598.
- Kiyosue, T., and Arita, M. (1989). Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* *64*, 389–397.
- Kranias, E.G., and Bers, D.M. (2007). Calcium and cardiomyopathies. *Subcell. Biochem.* *45*, 523–537.
- Labbé, S.M., Grenier-Larouche, T., Noll, C., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, E.E., and Carpentier, A.C. (2012). Increased myocardial uptake of dietary fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans. *Diabetes* *61*, 2701–2710.
- Lacombe, V.A., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Sridhar, A., Emani, S., Bonagura, J.D., Feldman, D.S., Györke, S., and Carnes, C.A. (2007). Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *293*, R1787–1797.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* *79*, 1317–1372.
- Lei, M., Zhang, H., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2007). SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* *74*, 356–365.
- Leifert, W.R., McMurchie, E.J., and Saint, D.A. (1999). Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Physiol.* *520 Pt 3*, 671–679.
- Leifert, W.R., Jahangiri, A., Saint, D.A., and McMurchie, E.J. (2000). Effects of dietary n-3 fatty acids on contractility, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in a rat cardiomyocyte model of arrhythmia. *J. Nutr. Biochem.* *11*, 382–392.
- Lengyel, C., Virág, L., Biró, T., Jost, N., Magyar, J., Biliczki, P., Kocsis, E., Skoumal, R., Nánási, P.P., Tóth, M., et al. (2007). Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc. Res.* *73*, 512–520.
- Levy, D., Larson, M.G., Vasan, R.S., Kannel, W.B., and Ho, K.K. (1996). The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *275*, 1557–1562.
- Li, G.R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M., and Nattel, S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.* *78*, 689–696.
- Li, G.-R., Sun, H.-Y., Chen, J.-B., Zhou, Y., Tse, H.-F., and Lau, C.-P. (2009). Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PloS One* *4*, e7307.

- Liu, D.W., and Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ. Res.* *76*, 351–365.
- Liu, S., and Zheng, P. (2013). Altered PKA modulation in the Nav1.1 epilepsy variant I1656M. *J. Neurophysiol.*
- Liu, L., Zhu, W., Zhang, Z.-S., Yang, T., Grant, A., Oxford, G., and Simon, S.A. (2004). Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. *J. Neurophysiol.* *91*, 1482–1491.
- Liu, M., Liu, H., and Dudley, S.C., Jr (2010). Reactive oxygen species originating from mitochondria regulate the cardiac sodium channel. *Circ. Res.* *107*, 967–974.
- Liu, M., Gu, L., Sulkin, M.S., Liu, H., Jeong, E.-M., Greener, I., Xie, A., Efimov, I.R., and Dudley, S.C., Jr (2013). Mitochondrial dysfunction causing cardiac sodium channel downregulation in cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *54*, 25–34.
- Logroscino, G., Hesdorffer, D.C., Cascino, G., Hauser, W.A., Coeytaux, A., Galobardes, B., Morabia, A., and Jallon, P. (2005). Mortality after a first episode of status epilepticus in the United States and Europe. *Epilepsia* *46 Suppl 11*, 46–48.
- Lossin, C., Wang, D.W., Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., and George, A.L., Jr (2002). Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* *34*, 877–884.
- Lu, T., Lee, H.C., Kabat, J.A., and Shibata, E.F. (1999). Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit. *J. Physiol.* *518 (Pt 2)*, 371–384.
- Lukas, A., and Antzelevitch, C. (1993). Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia. Role of the transient outward current. *Circulation* *88*, 2903–2915.
- Lundbaek, J.A., Birn, P., Hansen, A.J., Sogaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., Bruno, M.J., Tape, S.E., Egebjerg, J., Greathouse, D.V., et al. (2004). Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* *123*, 599–621.
- Ma, J., Luo, A., Wu, L., Wan, W., Zhang, P., Ren, Z., Zhang, S., Qian, C., Shryock, J.C., and Belardinelli, L. (2012). Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *302*, C1141–1151.
- Maltsev, V.A., Sabbah, H.N., Higgins, R.S., Silverman, N., Lesch, M., and Undrovinas, A.I. (1998). Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* *98*, 2545–2552.

- Marionneau, C., Lichti, C.F., Lindenbaum, P., Charpentier, F., Nerbonne, J.M., Townsend, R.R., and Mérot, J. (2012). Mass spectrometry-based identification of native cardiac Nav1.5 channel  $\alpha$  subunit phosphorylation sites. *J. Proteome Res.* *11*, 5994–6007.
- Matsuda, J.J., Lee, H., and Shibata, E.F. (1992). Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation. *Circ. Res.* *70*, 199–207.
- Matturri, L., Ottaviani, G., Ramos, S.G., and Rossi, L. (2000). Sudden Infant Death Syndrome (SIDS): a study of cardiac conduction system. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *9*, 137–145.
- Ménard, S.L., Croteau, E., Sarrhini, O., Gélinas, R., Brassard, P., Ouellet, R., Bentourkia, M., van Lier, J.E., Des Rosiers, C., Lecomte, R., et al. (2010). Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E1049–1057.
- Mikkelsen, K.L., Wiinberg, N., Høegholm, A., Christensen, H.R., Bang, L.E., Nielsen, P.E., Svendsen, T.L., Kampmann, J.P., Madsen, N.H., and Bentzon, M.W. (1997). Smoking related to 24-h ambulatory blood pressure and heart rate: a study in 352 normotensive Danish subjects. *Am. J. Hypertens.* *10*, 483–491.
- Mitchell, E.A., Ford, R.P., Stewart, A.W., Taylor, B.J., Becroft, D.M., Thompson, J.M., Scragg, R., Hassall, I.B., Barry, D.M., and Allen, E.M. (1993). Smoking and the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* *91*, 893–896.
- Moore, M.C., Satake, S., Lautz, M., Soleimanpour, S.A., Neal, D.W., Smith, M., and Cherrington, A.D. (2004). Nonesterified fatty acids and hepatic glucose metabolism in the conscious dog. *Diabetes* *53*, 32–40.
- Moreno, C., Macías, A., Prieto, A., de la Cruz, A., González, T., and Valenzuela, C. (2012). Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiac Ion Channels. *Front. Physiol.* *3*, 245.
- Murray, K.T., Hu, N.N., Daw, J.R., Shin, H.G., Watson, M.T., Mashburn, A.B., and George, A.L., Jr (1997). Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circ. Res.* *80*, 370–376.
- Nagao, Y., Harada, Y., Mukai, T., Shimizu, S., Okuda, A., Fujimoto, M., Ono, A., Sakagami, Y., and Ohno, Y. (2013). Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model. *Front. Cell. Neurosci.* *7*.
- Napolitano, C., Rivolta, I., and Priori, S.G. (2003). Cardiac sodium channel diseases. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* *41*, 439–444.
- Naritoku, D.K., Casebeer, D.J., and Darbin, O. (2003). Effects of seizure repetition on postictal and interictal neurocardiac regulation in the rat. *Epilepsia* *44*, 912–916.
- Navarro, H.A., Mills, E., Seidler, F.J., Baker, F.E., Lappi, S.E., Tayyeb, M.I., Spencer, J.R., and Slotkin, T.A. (1990). Prenatal nicotine exposure impairs beta-adrenergic function:

persistent chronotropic subsensitivity despite recovery from deficits in receptor binding. *Brain Res. Bull.* 25, 233–237.

Neff, R.A., Simmens, S.J., Evans, C., and Mendelowitz, D. (2004). Prenatal nicotine exposure alters central cardiorespiratory responses to hypoxia in rats: implications for sudden infant death syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9261–9268.

Nei, M., Ho, R.T., and Sperling, M.R. (2000). EKG abnormalities during partial seizures in refractory epilepsy. *Epilepsia* 41, 542–548.

Nei, M., Ho, R.T., Abou-Khalil, B.W., Drislane, F.W., Liporace, J., Romeo, A., and Sperling, M.R. (2004). EEG and ECG in sudden unexplained death in epilepsy. *Epilepsia* 45, 338–345.

O'Rourke, B., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., Kääh, S., Tunin, R., and Marbán, E. (1999). Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ. Res.* 84, 562–570.

Oliver, M.F., and Opie, L.H. (1994). Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. *Lancet* 343, 155–158.

Opherk, C., Coromilas, J., and Hirsch, L.J. (2002). Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Res.* 52, 117–127.

Ottaviani, G. (2011). Sudden infant and perinatal unexplained death: are we moving forward yet? *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 20, 302–306.

Patino, G.A., and Isom, L.L. (2010). Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunits in development and disease. *Neurosci. Lett.* 486, 53–59.

Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.

Pereira, L., Matthes, J., Schuster, I., Valdivia, H.H., Herzig, S., Richard, S., and Gómez, A.M. (2006). Mechanisms of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55, 608–615.

Pignier, C., Revenaz, C., Raully-Lestienne, I., Cussac, D., Delhon, A., Gardette, J., and Le Grand, B. (2007). Direct protective effects of poly-unsaturated fatty acids, DHA and EPA, against activation of cardiac late sodium current: a mechanism for ischemia selectivity. *Basic Res. Cardiol.* 102, 553–564.

Pu, J., and Boyden, P.A. (1997). Alterations of Na<sup>+</sup> currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness. *Circ. Res.* 81, 110–119.

- Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3289–3293.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *32*, 281–294.
- Regan, T.J., Lyons, M.M., Ahmed, S.S., Levinson, G.E., Oldewurtel, H.A., Ahmad, M.R., and Haider, B. (1977). Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* *60*, 884–899.
- Remy, S., Urban, B.W., Elger, C.E., and Beck, H. (2003). Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2648–2658.
- Richardt, G., and Tölg, R. (1997). [Cellular sequelae of myocardial ischemia]. *Z. Für Kardiologie 86 Suppl 1*, 23–32.
- Rogawski, M.A., and Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 553–564.
- Saint, D.A. (2006). The role of the persistent Na<sup>(+)</sup> current during cardiac ischemia and hypoxia. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *17 Suppl 1*, S96–S103.
- Saint, D.A., Ju, Y.K., and Gage, P.W. (1992). A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* *453*, 219–231.
- Sartiani, L., Stillitano, F., Luceri, C., Suffredini, S., Toti, S., De Filippo, C., Cuomo, V., Tattoli, M., Dolara, P., Mugelli, A., et al. (2010). Prenatal exposure to carbon monoxide delays postnatal cardiac maturation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *90*, 1582–1593.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., and Nattel, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ. Res.* *90*, 939–950.
- Schreibmayer, W., Dascal, N., Lotan, I., Wallner, M., and Weigl, L. (1991). Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel alpha-subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* *291*, 341–344.
- Shah, T., Sullivan, K., and Carter, J. (2006). Sudden infant death syndrome and reported maternal smoking during pregnancy. *Am. J. Public Health* *96*, 1757–1759.
- Shehadeh, A., and Regan, T.J. (1995). Cardiac consequences of diabetes mellitus. *Clin. Cardiol.* *18*, 301–305.

- Shryock, J.C., and Belardinelli, L. (2008). Inhibition of late sodium current to reduce electrical and mechanical dysfunction of ischaemic myocardium. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 1128–1132.
- Slotkin, T.A., Saleh, J.L., McCook, E.C., and Seidler, F.J. (1997). Impaired cardiac function during postnatal hypoxia in rats exposed to nicotine prenatally: implications for perinatal morbidity and mortality, and for sudden infant death syndrome. *Teratology* *55*, 177–184.
- Soliman, D., Wang, L., Hamming, K.S.C., Yang, W., Fatehi, M., Carter, C.C., Clanachan, A.S., and Light, P.E. (2012). Late sodium current inhibition alone with ranolazine is sufficient to reduce ischemia- and cardiac glycoside-induced calcium overload and contractile dysfunction mediated by reverse-mode sodium/calcium exchange. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *343*, 325–332.
- Song, Y., Shryock, J.C., Wagner, S., Maier, L.S., and Belardinelli, L. (2006). Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 214–222.
- Spampanato, J., Escayg, A., Meisler, M.H., and Goldin, A.L. (2001). Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7481–7490.
- Spampanato, J., Escayg, A., Meisler, M.H., and Goldin, A.L. (2003). Generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 mutation W1204R alters voltage-dependent gating of Na(v)1.1 sodium channels. *Neuroscience* *116*, 37–48.
- Sugawara, T., Mazaki-Miyazaki, E., Ito, M., Nagafuji, H., Fukuma, G., Mitsudome, A., Wada, K., Kaneko, S., Hirose, S., and Yamakawa, K. (2001a). Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* *57*, 703–705.
- Sugawara, T., Tsurubuchi, Y., Agarwala, K.L., Ito, M., Fukuma, G., Mazaki-Miyazaki, E., Nagafuji, H., Noda, M., Imoto, K., Wada, K., et al. (2001b). A missense mutation of the Na<sup>+</sup> channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6384–6389.
- Sun, H., Zhang, Y., Liang, J., Liu, X., Ma, X., Wu, H., Xu, K., Qin, J., Qi, Y., and Wu, X. (2008). SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J. Hum. Genet.* *53*, 769–774.
- Suzuki, J., Bayna, E., Dalle Molle, E., and Lew, W.Y.W. (2003). Nicotine inhibits cardiac apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* *41*, 482–488.
- Tahiliani, A.G., and McNeill, J.H. (1986). Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life Sci.* *38*, 959–974.
- Tang, Q., Ma, J., Zhang, P., Wan, W., Kong, L., and Wu, L. (2012). Persistent sodium current and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange contributes to the augmentation of the reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

exchange during hypoxia or acute ischemia in ventricular myocytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *463*, 513–522.

Tatli, E., Alicik, G., Buturak, A., Yilmaztepe, M., and Aktoz, M. (2013). Arrhythmias following revascularization procedures in the course of acute myocardial infarction: are they indicators of reperfusion or ongoing ischemia? *ScientificWorldJournal* *2013*, 160380.

Thuot, F., Lemaire, D., Dorion, D., Létourneau, P., and Praud, J.P. (2001). Active glottal closure during anoxic gasping in lambs. *Respir. Physiol.* *128*, 205–218.

Tigaran, S., Mølgaard, H., and Dam, M. (2002). Atrio-ventricular block: a possible explanation of sudden unexpected death in epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* *106*, 229–233.

Uchino, H., Kim, T., Lam, T.K.T., Yoshii, H., Klement, P., Williams, W., Kawamori, R., and Giacca, A. (2005). FK-614, a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, improves peripheral glucose utilization while decreasing hepatic insulin extraction in alloxan-induced diabetic dogs. *Metabolism.* *54*, 1250–1258.

Undrovinas, A., and Maltsev, V.A. (2008). Late sodium current is a new therapeutic target to improve contractility and rhythm in failing heart. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* *6*, 348–359.

Undrovinas, A.I., Maltsev, V.A., and Sabbah, H.N. (1999). Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *55*, 494–505.

Vijayaragavan, K., Boutjdir, M., and Chahine, M. (2004). Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *J. Neurophysiol.* *91*, 1556–1569.

Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R.A., Kang, J.X., Leaf, A., and Wadman, W.J. (1996). Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12559–12563.

Watson, C.L., and Gold, M.R. (1997). Modulation of Na<sup>+</sup> current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells. *Circ. Res.* *81*, 380–386.

West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>(+)</sup>-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10910–10914.

Wielgus, J.J., Corbin Downey, L., Ewald, K.W., Hatley, M.E., Wilson, K.C., and Yeilding, R.H. (2004). Exposure to low concentrations of nicotine during cranial nerve development inhibits apoptosis and causes cellular hypertrophy in the ventral oculomotor nuclei of the chick embryo. *Brain Res.* *1000*, 123–133.

- Wittköpper, K., Dobrev, D., Eschenhagen, T., and El-Armouche, A. (2011). Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological  $\beta$ -adrenoceptor signalling. *Cardiovasc. Res.* *91*, 392–401.
- Wu, Y., Song, Y., Belardinelli, L., and Shryock, J.C. (2009). The late Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) inhibitor ranolazine attenuates effects of palmitoyl-L-carnitine to increase late I<sub>Na</sub> and cause ventricular diastolic dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 550–557.
- Xiao, G.Q., Qu, Y., Sun, Z.Q., Mochly-Rosen, D., and Boutjdir, M. (2001). Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na<sup>(+)</sup> channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *281*, C1477–1486.
- Xiao, Y.F., Kang, J.X., Morgan, J.P., and Leaf, A. (1995). Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na<sup>+</sup> channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 11000–11004.
- Xiao, Y.-F., Sigg, D.C., and Leaf, A. (2005). The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J. Membr. Biol.* *206*, 141–154.
- Xu, X., Guo, F., Lv, X., Feng, R., Min, D., Ma, L., Liu, Y., Zhao, J., Wang, L., Chen, T., et al. (2013). Abnormal changes in voltage-gated sodium channels NaV1.1, NaV1.2, NaV1.3, NaV1.6 and in calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II, within the brains of spontaneously epileptic rats and tremor rats. *Brain Res. Bull.* *96*, 1–9.
- Yan, X., Gao, S., Tang, M., Xi, J., Gao, L., Zhu, M., Luo, H., Hu, X., Zheng, Y., Hescheler, J., et al. (2011). Adenylyl cyclase/cAMP-PKA-mediated phosphorylation of basal L-type Ca(2<sup>+</sup>) channels in mouse embryonic ventricular myocytes. *Cell Calcium* *50*, 433–443.
- Yarbrough, T.L., Lu, T., Lee, H.-C., and Shibata, E.F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ. Res.* *90*, 443–449.
- Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* *4*, 207.
- Yu, J.Z., Rodrigues, B., and McNeill, J.H. (1997). Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* *34*, 91–98.
- Yue, L., Wang, Z., Rindt, H., and Nattel, S. (2000). Molecular evidence for a role of Shaw (Kv3) potassium channel subunits in potassium currents of dog atrium. *J. Physiol.* *527 Pt 3*, 467–478.
- Zarain-Herzberg, A., Yano, K., Elimban, V., and Dhalla, N.S. (1994). Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>)-ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *203*, 113–120.

Zarraga, I.G.E., and Ware, D.L. (2007). Syncope, seizure, or both? An unusual case of complete heart block. *J. Electrocardiol.* *40*, 493–495.

Zheng, L., Yu, L., Tu, Q., Zhang, M., He, H., Chen, W., Gao, J., Yu, J., Wu, Q., and Zhao, S. (2000). Cloning and mapping of human PKIB and PKIG, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including PKIA. *Biochem. J.* *349*, 403–407.

Zhong, Y., Ahmed, S., Grupp, I.L., and Matlib, M.A. (2001). Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *281*, H1137–1147.

Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A.L., Jr, and Murray, K.T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ. Res.* *87*, 33–38.

Zygmunt, A.C., Eddlestone, G.T., Thomas, G.P., Nesterenko, V.V., and Antzelevitch, C. (2001). Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *281*, H689–697.