

Université de Montréal

**Déterminants moléculaires de la sensibilité à  
la flécainide des canaux potassiques voltage  
dépendants**

par

Daniel Herrera

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention  
du grade de Maîtrise en Pharmacologie.

Décembre 2004

© Daniel Herrera, 2004



W

4

U58

2005

V. 050

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

# Identification du Jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

## **Déterminants moléculaires de la sensibilité à la flécainide des canaux potassiques voltage dépendants**

Présenté par :

**Daniel Herrera**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dre Teresa Kus**  
Président-rapporteur

**Dr Stanley Nattel**  
Directeur de recherche

**Dr Zhiguo Wang**  
Membre du jury

## SOMMAIRE

Le système cardiaque exprime une grande variété de canaux potassiques. Le potentiel membranaire durant le potentiel d'action cardiaque est responsable de l'activation ou l'inactivation des courants voltage dépendants. Le courant endogène  $I_{Kur}$  est, partiellement, responsable de la repolarisation du potentiel d'action auriculaire. Il est formé par les sous unités Kv3.1 et Kv1.5 chez le chien et l'homme, respectivement. Leurs propriétés biophysiques sont très similaires, par contre, leur pharmacologie diffère. Nos travaux ont consisté à étudier les bases moléculaires déterminant ces différences pharmacologiques. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les différences dans les séquences des bases moléculaires respectives des canaux endogènes sont responsables des différences de la sensibilité aux différentes drogues entre le courant humain  $I_{Kur}$  et canin  $I_{Kur.d}$ .

Nous avons comparé l'effet de la flécaïnide sur Kv1.5 et Kv3.1. Nous avons confirmé que le canal encodé par Kv3.1 est plus sensible à la flécaïnide que celui encodé par Kv1.5. À l'aide de protéines mutantes, nous avons établi que la mutation d'un résidu du domaine S6 de Kv3.1 dans la position équivalente de Kv1.5 confère à celle-ci la sensibilité à la flécaïnide observée pour Kv3.1. Nous avons démontré que les canaux portant le courant  $I_{to}$  encodés par Kv4.2 sont très sensibles à la flécaïnide, tandis que ceux formés par Kv1.4 sont relativement insensibles. L'introduction des mêmes mutations dans ces sous unités, qui codent le courant transitoire sortant cardiaque, produit le même effet. La modélisation de la région du pore, par homologie, a pu démontrer l'interaction de la flécaïnide avec le canal.

Ainsi, l'étude plus détaillée des propriétés pharmacologiques des canaux potassiques est nécessaire afin de pouvoir développer des antiarythmiques plus sélectifs pour une cible, telle que l'oreillette, prolongeant la période réfractaire du potentiel d'action et mettant fin à la fibrillation auriculaire sans affecter de façon indésirable les ventricules.

Mots clés : Électrophysiologie, canaux potassiques, repolarisation, pharmacologie, cœur, structure fonction

## SUMMARY

The heart expresses a great variety of potassium channels. The membrane potential during the action potential is responsible for the activation and inactivation of voltage-dependent currents. The endogenous current  $I_{Kur}$  is partially responsible for the repolarization of the atrial action potential. It is formed by Kv3.1 and Kv1.5 subunits in dog and man, respectively. Their biophysical properties are very similar, however, their pharmacology differs. Our work consisted of studying the molecular bases determining these pharmacological differences. We put out the hypothesis that the difference in pharmacology between the human  $I_{Kur}$  and its canine counterpart,  $I_{Kur,d}$ , is due to differences in the molecular bases of their respective underlying subunits.

We first compared the effects of flecainide on wild type Kv1.5 and Kv3.1 channel subunits expressed in *Xenopus* oocytes. We confirmed that the channel encoded by the Kv3.1 subunit is more sensitive to flecainide than the channel encoded by Kv1.5. With the use of mutant channels we were able to establish that mutation of a residue in the S6 transmembrane domain of Kv3.1 into the equivalent position in Kv1.5 confers flecainide sensitivity similar to that seen for the wild type Kv3.1. It has been shown that channels formed by Kv4.2 subunits are very sensitive, whereas, those formed by Kv1.4 subunits are relatively insensitive to flecainide. Remarkably, introduction of identical mutations into these subunits encoding the transient outward current had similar effects. That is, when introduced into the insensitive Kv1.4 subunit the residue from the sensitive Kv4.2 subunit confers its characteristic flecainide sensitivity. We subsequently used a homology model for the channels and were able to demonstrate the interaction of flecainide.

Further study of the pharmacological properties of these potassium channels is necessary in order to develop more specific antiarrhythmics to target the atria exclusively prolonging the refractory period of the action potential and terminating atrial fibrillation without having undesired effects on the ventricles.

Keywords: Electrophysiology, voltage-gated potassium channels, heart, pharmacology, repolarization, structure function

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvi
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	xvii
DÉDICACE.....	xviii
 <b>Première partie : Introduction et revue de la littérature.....</b>	 <b>19</b>
 <b>CHAPITRE PREMIER : LE POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE ET LES CANAUX QUI LE CONTROLE.....</b>	 <b>20</b>
 <b>1- Électrophysiologie cardiaque.....</b>	 <b>21</b>
<b>1-1 Excitation électrique et la conduction du potentiel d'action.....</b>	<b>21</b>
<b>1-2 Les courants dépolarisants.....</b>	<b>24</b>
<b>1-2-1 Le courant sodium (<math>I_{Na}</math>).....</b>	<b>25</b>
<b>1-2-1-1 Rôle physiologique.....</b>	<b>25</b>
<b>1-2-1-2 Propriétés biophysiques.....</b>	<b>25</b>
<b>1-2-1-3 Propriétés pharmacologiques de <math>I_{Na}</math>.....</b>	<b>26</b>
<b>1-2-2 Le courant calcique (<math>I_{Ca}</math>).....</b>	<b>27</b>
<b>1-2-2-1 Rôle physiologique.....</b>	<b>27</b>
<b>1-2-2-2 Les canaux <math>Ca^{2+}</math> de type T et L.....</b>	<b>28</b>
<b>1-2-2-3 Propriétés biophysiques.....</b>	<b>29</b>

1-2-3 Le courant activé par l'hyperpolarisation ( $I_f$ ).....	30
1-2-3-1 Base moléculaire.....	31
1-3 Les courants repolarisants.....	32
1-3-1 Les canaux potassiques.....	32
1-3-1-1 Le courant $K^+$ transitoire sortant ( $I_{to}$ ).....	33
1-3-1-1-1 Rôle physiologique.....	33
1-3-1-1-2 Différences régionales.....	34
1-3-1-1-3 Composantes de $I_{to}$ .....	34
1-3-1-1-4 Bases moléculaires de $I_{to}$ .....	35
1-3-1-1-5 Propriétés biophysiques.....	36
1-3-1-1-6 Propriétés pharmacologiques de $I_{to}$ .....	38
1-3-1-2 Le courant sortant retardé à rectification ( $I_K$ ).....	38
1-3-1-2-1 Rôle physiologique.....	39
1-3-1-2-2 Les composantes de $I_K$ .....	39
1-3-1-2-2-1 La composante rapide ( $I_{Kr}$ ).....	39
1-3-1-2-2-1-1 Base moléculaire.....	40
1-3-1-2-2-1-2 Pharmacologie de $I_{Kr}$ .....	41
1-3-1-2-2-2 La composante lente ( $I_{Ks}$ ).....	42
1-3-1-2-2-2-1 Base moléculaire et rôle physiologique.....	42
1-3-1-2-2-2-2 Pharmacologie de $I_{Ks}$ .....	43
1-3-1-2-3 Propriétés biophysiques.....	44
1-3-1-2-4 Différences régionales.....	45
1-3-1-3 Le courant sortant ultra rapide retardé à rectification ( $I_{Kur}$ ).....	46



1-3-1-3-1 Rôle physiologique et base moléculaire.....	46
1-3-1-3-2 Propriétés biophysiques.....	46
1-3-1-3-3 Propriétés pharmacologiques de $I_{Kur}$ .....	47
1-3-1-4 Courant sortant à rectification entrante ( $I_{K1}$ ).....	48
1-3-1-4-1 Rôle physiologique.....	48
1-3-1-4-2 Base moléculaire.....	49
1-3-1-4-3 Propriétés pharmacologiques de $I_{K1}$ .....	50
1-4 D'autres courants repolarisants.....	51
1-4-1 Le courant potassique activé par l'acétylcholine ( $I_{KACH}$ ).....	51
1-4-1-1 Rôle physiologique.....	51
1-4-1-2 Base moléculaire.....	51
1-4-2 Le courant sensible à l'ATP ( $I_{KATP}$ ).....	52
1-4-2-1 Rôle physiologique et propriétés biophysiques.....	52
1-4-2-2 Base moléculaire.....	52
<b>CHAPITRE DEUXIÈME : STRUCTURE DES CANAUX VOLTAGE DÉPENDANTS CARDIAQUES.....</b>	<b>54</b>
<b>2 Structure des canaux voltage dépendants cardiaques.....</b>	<b>55</b>
<b>2-1 Le canal sodique (<math>I_{Na}</math>).....</b>	<b>55</b>
2-1-1 Nomenclature.....	56
2-1-2 Structure de la sous unité $\alpha$ de $I_{Na}$ .....	57
2-1-3 Structure de la sous unité $\beta$ de $I_{Na}$ .....	60
<b>2-2 Les canaux calciques.....</b>	<b>60</b>
2-2-1 Nomenclature.....	63

2-2-2 Structure des canaux calciques.....	63
2-2-3 Les canaux calciques de type L et T.....	65
2-3 Les canaux potassiques.....	66
2-3-1 Clonage des canaux $K^+$ .....	67
2-3-2 Structure des canaux $K^+$ .....	69
2-3-3 Sous unités accessoires.....	70
2-3-4 Relations structure-fonction des canaux $K^+$ voltage dépendants.....	71
2-3-4-1 Inactivation.....	71
2-3-4-1-1 Inactivation de type N.....	71
2-3-4-1-2 Inactivation de type C.....	72
2-3-4-2 Senseur de voltage et l'activation.....	72
2-3-4-3 La structure du pore.....	73
2-3-4-4 Sélectivité des ions.....	73
2-3-4-5 Rectification entrante des canaux Kir.....	76
<b>CHAPITRE TROISIÈME : MÉCANISMES DE BASE DE L'ARYTHMIE CARDIAQUE.....</b>	<b>77</b>
<b>3 Les mécanismes de l'arythmie cardiaque.....</b>	<b>78</b>
3-1 Les post-dépolarisations précoces (EADs).....	78
3-2 Les post-dépolarisations tardives (DADs).....	79
3-3 L'automatisme anormale.....	80
3-4 La réentrée.....	81
3-4-1 La fibrillation.....	81
3-5 Le problème de la proarythmie.....	83

<b>Deuxième partie : Contribution originale.....</b>	<b>84</b>
<b>HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE PREMIER : A SINGLE RESIDU IN THE S6 TRANSMEMBRANE DOMAIN GOVERNS THE DIFFERENTIAL FLECAINIDE SENSITIVITY OF VOLTAGE GATED POTASSIUM CHANNELS.....</b>	<b>87</b>
<b>1 Abstract.....</b>	<b>90</b>
<b>2 Introduction.....</b>	<b>91</b>
<b>3 Materials and Methods.....</b>	<b>93</b>
<b>3-1 Molecular Biology.....</b>	<b>93</b>
<b>3-2 Oocyte Isolation.....</b>	<b>94</b>
<b>3-3 Data Acquisition and Analysis.....</b>	<b>95</b>
<b>3-4 Homology Modeling of the Kv3.1 Pore.....</b>	<b>95</b>
<b>4 Results.....</b>	<b>97</b>
<b>4-1 Effects of Flecaïnide on Kv3.1 and Kv1.5.....</b>	<b>97</b>
<b>4-2 Response of Kv3.1/Kv1.5 Chimeras to Flecaïnide.....</b>	<b>100</b>
<b>4-3 Effects of Mutating Candidate Amino Acids in Kv3.1         and Kv1.5 on Flecaïnide Sensitivity.....</b>	<b>101</b>
<b>4-4 Biophysical Effects of the S6 Isoleucine/Leucine Mutations in         Kv3.1 and Kv1.5.....</b>	<b>103</b>
<b>4-5 Effects of Corresponding Mutations in Kv1.4 and Kv4.2.....</b>	<b>103</b>
<b>5 Discussion.....</b>	<b>105</b>
<b>5-1 Comparison with Previous Studies of Molecular Determinants of         Cardiac Ion-Channel Block.....</b>	<b>105</b>

5-2 Model of Kv3.1 Channel Pore.....	107
5-3 Potential Importance of our Findings.....	109
5-4 Potential Limitations.....	109
6 Acknowledgments.....	111
7 References.....	112
8 Figures and Figure Legends.....	118
9 Tables.....	127
<b>Troisième partie : Discussion générale et conclusion.....</b>	<b>130</b>
1 Comparaison à d'autres études des déterminants moléculaires du bloc de canaux ioniques cardiaques.....	131
2 Limites potentielles de nos études électrophysiologiques dans le système d'expression d'ovocytes de Xénopes.....	133
3 Directions futures.....	134
4 Conclusion.....	138
<b>Sources documentaires.....</b>	<b>cx1</b>
<b>Appendices.....</b>	<b>clxx</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## PREMIÈRE PARTIE

### TABLEAU I :

Classification, fonction physiologique et pharmacologie des canaux  $Ca_v$ .....62

### TABLEAU II :

Classification, localisation et pharmacologie des canaux potassiques  $K_v$ .....68

### TABLEAU III :

Alignement de la séquence déduite de la région du pore des canaux  $K^+$  .....74

## DEUXIÈME PARTIE

### TABLEAU I :

Primers used for chimera and point mutation construction.....127

### TABLEAU II :

Rate constants for wild-type and mutant channels.....128

### TABLEAU III :

Biophysical properties of wild-type and mutant clones.....129

# LISTE DES FIGURES

## PREMIÈRE PARTIE

### FIGURE 1 :

Variations des morphologies du potentiel d'action dans différentes régions du coeur.....22

### FIGURE 2 :

Potentiel d'action cardiaque.....23

### FIGURE 3 :

Homologies de la séquence protéique des sous unités du courant sodique.....57

### FIGURE 4 :

Structure de la sous unité des canaux sodiques voltage dépendants.....58

### FIGURE 5 :

Structure des sous unités des canaux  $Ca_v1$ .....63

### FIGURE 6 :

Vue de profile de la topologie des trois types de sous unités  $K^+$  .....67

### FIGURE 7 :

Vue de l'assemblage des quatre sous unités de canaux  $K^+$  voltage dépendants.....69

### FIGURE 8 :

La voie de conduction des canaux  $K^+$  .....75

### FIGURE 9 :

Schéma illustrant la taille de l'oreillette comparée au nombre de circuits.....82

## DEUXIÈME PARTIE

### FIGURE 1 :

Flecainide inhibition of Kv3.1 and Kv1.5 currents expressed in *Xenopus* oocytes.....118

### FIGURE 2 :

Effects of four concentrations of flecainide on representative currents.....119

### FIGURE 3 :

Time dependent flecainide effects.....120

### FIGURE 4 :

Effects of flecainide on currents carried by WT and chimeric subunits.....121

### FIGURE 5 :

Amino acid sequence comparison of the region between the beginning of the S5-S6 linker and the distal S6 in four clones.....122

### FIGURE 6 :

Effects of four concentrations of flecainide on currents carried by various clones.....123

### FIGURE 7 :

Effects of flecainide on  $I_{to}$ -forming subunits.....124

### FIGURE 8 :

Pore homology model of Kv3.1.....125

## TROISIÈME PARTIE

### FIGURE 1 :

Alignement des séquences de tous les canaux Kv.....135

# LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

4-AP: 4- Aminopyridine

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine tri phosphate

BTZ : Benzothiazépine

CAST : « Cardiac Arrhythmia Suppression Trial »

DHP : Dihydropyridine

Endo: Endocarde

Epi: Épicarde

ERG: « Ether a-go-go related gene »

FV : Fibrillation Ventriculaire

HERG : human ether-a-go-go related gene

$I_K$  : Courant potassique sortant retardé à rectification

$I_{K1}$ : Courant potassique entrant à rectification entrante

$I_{KACH}$ : Canal potassique sensible à l'acétylcholine.

$I_{KATP}$  : Canal potassique sensible à l'ATP.

$I_{Kr}$  : Composante rapide du courant potassique sortant retardé à rectification

$I_{Ks}$  : Composante lente du courant potassique sortant retardé à rectification

$I_{Kur}$  : Courant sortant ultra rapide retardé à rectification

$I_{Kur.d}$  : Courant canin sortant ultra rapide retardé à rectification

$I_{to}$ : Courant transitoire sortant

$K_{ir}$ : Canal potassique sortant à rectification entrante

$K_v$ : Canal potassique voltage dépendant

PAA: Phénylalkylamine

PCR : Polymerase Chain Reaction


SUR: Récepteur aux sulfonylurées

TdP : Torsade de pointe

TEA: Tétra éthyle ammonium

TV : Tachycardie Ventriculaire





$\omega$ -ATX :  $\omega$ -agatoxine

$\omega$ -CTX :  $\omega$ -connotoxine

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Stanley Nattel pour son soutien inconditionnel, sa compréhension, sa patience et son humanité.

Je désire aussi, présenter mes plus sincères remerciements au Dr Lixia Yue qui m'a enseignée les techniques de base de l'électrophysiologie.

Je voudrais également remercier mes proches collaborateurs, Maya Mamarbassi, Dr Zhiguo Wang, Dr Lucie Parent, Dr Rémy Sauvé, Dr Gernot Schram, Marc Pourrier et Manuel Simoes ainsi qu'à mes collègues de laboratoire, Stephen Zicha, Dr Joachim Ehrlich, Dr Ricardo Caballero, Peter Melnyk, Dr Pierre Coutu et aux techniciennes de laboratoire Evelyn Landry, Xiao Fan Yang, Chantal St Cyr, Chantal Maltais et Nathalie L'Heureux.

Je réserve un merci particulier à Maya Mamarbassi qui, par sa compétence et surtout sa patience a contribué d'une manière importante à l'amélioration de mes habilités techniques en biologie moléculaire.

Je voudrais adresser ma plus profonde reconnaissance à mon épouse, Nadine, qui m'a toujours soutenue autant dans les moments d'échec que dans les périodes de succès.

À ma mère et mon grand père, sans leur amour et dévouement inconditionnel et leur encouragement acharné ce rêve ne se serait jamais réalisé. J'apprécierais toujours la confiance et le soutien moral qu'ils m'ont accordés.

À mon frère, Serge et au reste de ma famille et amis, sur plusieurs continents, qui ont toujours cru en moi et ont toujours été fier de moi.

À mes beaux-parents, Edward et Hélène, pour leur soutien moral, encouragement, patience et direction.

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

**Herrera D.**, Mamarbachi A.M., Simoes M., Parent L., Sauvé R., Wang Z., Nattel S. A Single Residue in the S6 Transmembrane Domain Governs the Differential Flecaïnide Sensitivity of Voltage-gated Potassium Channels. (Ce manuscrit a été resoumis à la revue *Molecular Pharmacology* suite à une demande de révision par le comité éditorial.).

Dans cette étude, j'ai réalisé l'ensemble des expériences, analysé les résultats et préparé les figures. J'ai effectué la partie biologie moléculaire qui consistait en la construction des nombreuses chimères et protéines Kv3.1, Kv1.5, Kv1.4 et Kv4.2 mutées et l'enregistrement des courants à partir d'ovocytes de Xénopes injectées avec les différents ARN complémentaires. Maya Mamarbachi a contribué à la construction des chimères tandis que Manuel Simoes et Dr Sauvé ont construit le modèle par homologie de la voie de conduction des canaux. Le Dr Parent a contribué à la conceptualisation de la partie structure fonction du projet. J'ai rédigé l'article sous la supervision de mon directeur de recherche. Dr Nattel a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de cet article.

On ne fait jamais attention à ce qui a été fait, on ne voit ce qui reste à faire.

*Marie Curie, 1894*

**PREMIÈRE PARTIE:**  
**INTRODUCTION ET REVUE DE  
LA LITTÉRATURE**

# **CHAPITRE PREMIER**

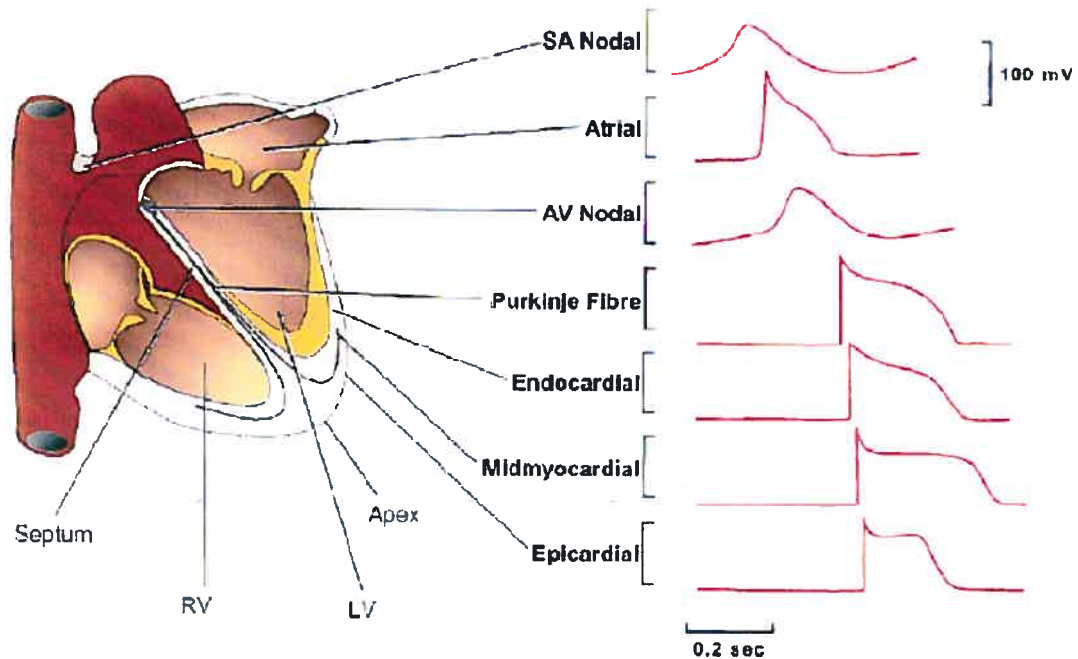
## **LE POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE ET LES CANAUX QUI LE CONTROLENT**

## 1 Électrophysiologie cardiaque

Dans le cœur, le couplage structural et fonctionnel de millions de cellules forme la pompe qui livre le sang au reste du corps. Plusieurs types de canaux ioniques différents jouent leur rôle dans ce processus complexe qui résulte dans le potentiel d'action cardiaque. Le développement de techniques d'isolation de cellules cardiaques adultes viables durant les années 1970<sup>(1)</sup> couplé au développement de la technique de voltage imposé rendit possible la mesure et la caractérisation de courants ioniques transmembranaires présents dans ces cellules<sup>(2;3)</sup>.

### 1-1 Excitation électrique et la conduction du potentiel d'action

Le battement normal du cœur est déterminé par la propagation ordonnée de stimuli électriques résultant en la dépolarisation rapide et la repolarisation lente qui génère des potentiels d'action dans les myocytes. On retrouve des distributions différentes de courants ioniques dans chaque type de cellule cardiaque et ensemble elles produisent une séquence d'événements ordonnés allant du « pacemaker » nœud sinusal au dernier potentiel d'action ventriculaire. Chaque région du cœur exprime des courants différents, en quantités différentes, et par conséquent, on observe des morphologies de potentiel d'action variées.

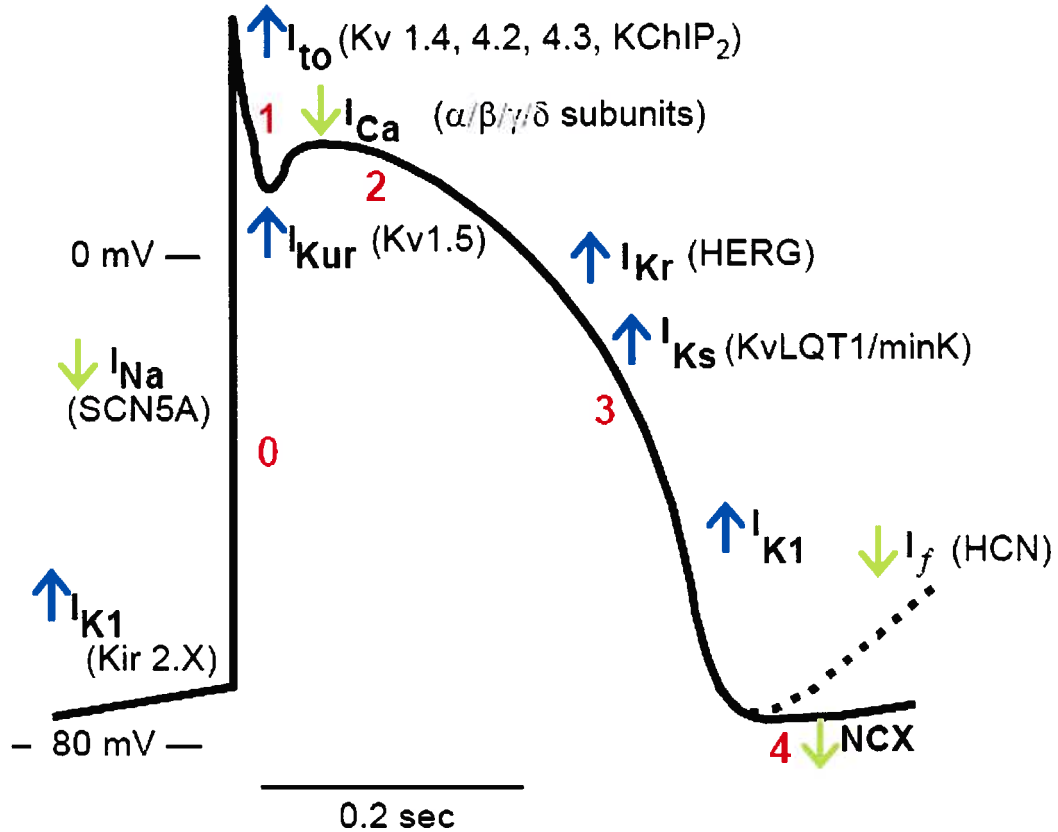


**Figure 1:** Variations des morphologies du potentiel d'action dans différentes régions du coeur. Représentation schématique du coeur et enregistrements de potentiels d'action de chacune des régions du coeur en tenant compte de la séquence temporelle de la propagation du stimulus électrique. RV: ventricule droit; LV: Ventricule gauche; SA: nœud sinusal; AV: nœud auriculo-ventriculaire.<sup>(4)</sup>

Les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire ont des potentiels d'action plus lents, tandis que les fibres de Purkinje, l'oreillette et le ventricule ont des potentiels d'action plus rapides (Figure 1). Le nœud sinusal contient des cellules qui ont des propriétés intrinsèques de génération de courants pacemaker, et il est dépolarisé très rapidement en phase 4 du potentiel d'action.

Le potentiel d'action cardiaque typique peut être divisé en cinq phases distinctes.





**Figure 2 :** Potentiel d'action cardiaque mettant en évidence les courants entrants ( $I_{Na}$ ,  $I_f$ ,  $I_{Ca}$ , et  $NCX$ ) et sortants ( $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ ) et les phases distinctes du potentiel d'action cardiaque.

Chacune des phases est composée de courants entrants et sortants (incluant les courants calciques, sodiques, potassiques et chlore), qui correspondent à la dépolarisation et la repolarisation du potentiel d'action. La phase 0 consiste en une dépolarisation rapide du potentiel de repos membranaire partant d'approximativement -80 mV à +40 mV et cette dépolarisation est déclenchée par l'influx d'un nombre important d'ions de sodium via les canaux sodiques, créant le courant sodium ( $I_{Na}$ ). La dépolarisation de la phase 0 enchaîne l'activation des courants sortants potassiques variés de la phase 1, tels que le courant transitoire sortant ( $I_{to}$ ) et le courant ultrarapide retardé à rectification ( $I_{Kur}$ ),

qui sont très sensibles aux changements électriques durant la dépolarisation. Cette phase de la repolarisation rapide est suivie de l'activation des courants de la phase 2. Durant cette phase les courants entrants tels que le courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ) et la composante retardée du courant sodique ( $I_{Na,L}$ ) contrebalancent les courants sortants tels que  $I_{Kur}$  et les courants à activation rapide et lente du courant retardé à rectification,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ . Cet équilibre, qui est typique du potentiel d'action cardiaque est plus connu sous le nom de « plateau ». L'influx de  $Ca^{2+}$  durant cette phase est essentiel au couplage électromécanique du cœur, puisque les ions de  $Ca^{2+}$  enclenchent le mouvement contractile des filaments qui cause la contraction du muscle cardiaque. La phase 3 est la période finale de la repolarisation, celle-ci est dominée par les courants sortants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ . Une fois la repolarisation terminée, le maintien du potentiel de repos en phase 4 est contrôlé par le courant entrant à rectification ( $I_{K1}$ ). Dans les régions ayant des propriétés intrinsèques de stimulation, telles que le nœud sinusal, le courant activé par l'hyperpolarisation ( $I_f$ ) est capable, au cours de la phase 4, de dépolariser les cellules pour qu'elles atteignent le seuil du déclenchement d'un potentiel d'action.

## 1-2 Les courants dépolarisants

Le courant excitateur dépolarisant de l'oreillette, du ventricule et des cellules de Purkinje est le courant sodique ( $I_{Na}$ ). Il s'active rapidement et génère un courant large qui produit une vitesse de conduction très rapide. Le courant excitateur principal dans les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire est le courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ).  $I_{CaL}$  est plus petit et s'active plus lentement que  $I_{Na}$  et donc  $I_{CaL}$  produit une vitesse de conduction plus lente dans ces tissus (Figure 1).

## 1-2-1 Le courant sodium ( $I_{Na}$ )

### 1-2-1-1 Rôle physiologique

$I_{Na}$  est le courant dépolarisant du potentiel d'action de l'oreillette, du ventricule et des cellules de Purkinje. Il s'active rapidement en phase 0. L'intensité maximale de  $I_{Na}$  excède, de loin, celle de tout autre courant cardiaque, causant une dépolarisation extrêmement rapide, permettant ainsi la propagation de l'excitation et la dépolarisation synchrone à travers les tissus du cœur, afin d'éjecter le sang des compartiments du cœur d'une manière efficace<sup>(5)</sup>.

### 1-2-1-2 Propriétés biophysiques

Le courant  $I_{Na}$  de différentes espèces, notamment du rat<sup>(6)</sup>, du chat<sup>(7)</sup>, de l'homme<sup>(8)</sup>, du chien<sup>(9)</sup>, et de la souris<sup>(10)</sup>, a été étudié et ses cinétiques de bases semblent être très semblables. Les relations courant-voltage (I-V) atteignent leur sommet entre -40 et -30 mV. La cinétique d'activation du  $I_{Na}$  est voltage dépendante. Cette activation est aussi dépendante de la température puisqu'à 12 °C le courant prend 1.4 ms avant d'atteindre le sommet, tandis qu'à 22 °C cette valeur est réduite par 80%<sup>(11)</sup>. La cinétique de dégradation du courant suit une fonction biexponentielle<sup>(9)</sup>, la constante de temps lente contribuant jusqu'à 20% de cette dégradation.

L'étude de la dépendance en voltage du « gating » et des propriétés cinétiques a montré que les canaux sodiques cyclent entre trois états conformationnels : l'état fermé, l'état ouvert, et l'état inactivé. Ces trois conformations sont, non seulement, importantes

physiologiquement mais sont aussi importantes pour les interactions entre ces canaux et les agents antiarythmiques. Comparés aux canaux sodiques du système nerveux, ceux du système cardiaque sont cinétiquement plus lents; sont résistants à la tétrodotoxine (TTX) et à la saxitoxine (STX) (dans le système cardiaque les canaux sodiques sont bloqués par des concentrations dans les micromolaires tandis que dans le système nerveux ils sont bloqués au nanomolaires)<sup>(12)</sup>; sont sensibles au bloc d'ions divalents tels que le  $\text{Cd}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$ ; et sont plus sensibles aux anesthésiques locaux tel que la lidocaïne.

### 1-2-1-3 Propriétés pharmacologiques de $I_{\text{Na}}$

Le courant sodique ( $I_{\text{Na}}$ ) cardiaque est encodé par  $\text{Na}_v1.5$ <sup>(13)</sup>. Les courants  $\text{Na}^+$  cardiaques sont la cible principale de la classe I des antiarythmiques tels que la quinidine, la procainamide, la flécainide et la disopyramide. Les bloqueurs de canaux sodiques réduisent l'ectopie auriculaire et ventriculaire en réduisant l'excitabilité cardiaque et sont efficaces dans le traitement de la fibrillation auriculaire par des mécanismes incompris à ce jour<sup>(14)</sup>. L'étude CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) a démontrée que le bloc de canaux sodiques en association avec la suppression de la formation de complexes ectopiques, augmentait la mortalité subite dans une population de patients ayant une maladie coronarienne<sup>(15;16)</sup>. Ces effets sont dus à l'action proarythmique provoquée par la suppression de l'excitabilité et le ralentissement de la conduction dans le tissu myocardique ischémique<sup>(17)</sup>. Suite à l'expérience de CAST, l'usage<sup>(16;17)</sup> et le développement de nouveaux bloqueurs de canaux  $\text{Na}^+$  ont diminué. Il reste encore à voir si ce sera possible de créer de nouveaux agents antiarythmiques avec des propriétés de bloc du courant sodique incluant une réduction

(ou l'absence) du risque proarythmique. Par contre, une stratégie utilisant des nouveaux agents de la famille des arylpipérazines (notamment RSD 992 et RSD 1000<sup>(18)</sup>) pour cibler les canaux sodiques situés dans des régions arythmiques atteintes d'ischémie à des rythmes cardiaques pathologiques semble être sélective contre les arythmies induites par l'ischémie puisque ces agents ont des  $pK_a$  qui se rapprochent du pH caractéristique du tissu ischémique. Le RSD1000 fut synthétisé afin d'être sélectif au myocarde ischémique en minimisant la concentration de l'espèce cationique dans le tissu non ischémique et, possiblement dans les tissus extra cardiaques. Ceci fut accompli en minimisant le degré d'ionisation à des pH physiologiques relativement aux niveaux élevés de  $[H^+]$  extracellulaire durant l'ischémie aiguë du myocardique. Le RSD1000 contient un groupe *N*-morpholin qui contribue au  $pK_a$  de 6.1. En milieu acide de pH ~6.4, la majorité du RSD1000 est dans un état ionisé, tandis qu'en milieu de pH 7.3, soit neutre, cette valeur tombe à 5% de la valeur totale de RSD1000. Donc durant une ischémie aiguë du tissu du myocarde, ceci devrait emmener à une augmentation locale de la concentration de l'espèce protonisée du RSD1000.

## **1-2-2 Le courant calcique ( $I_{Ca}$ )**

### **1-2-2-1 Rôle physiologique**

Les canaux calciques  $Ca^{2+}$  jouent un rôle important dans la dépolarisation des pacemakers, le support de la conduction via le nœud auriculo-ventriculaire et le maintien du plateau durant le potentiel d'action. Les canaux  $Ca^{2+}$  sont responsables de la morphologie du potentiel d'action et de l'excitabilité cellulaire.  $I_{Ca}$  déclenche et

contrôle les processus régulateurs de la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique qui est impliqué dans le couplage excitation-contraction du myocarde<sup>(19)</sup>. De plus, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux calciques traduit les signaux électriques en des événements biochimiques et mécaniques primordiaux.

### 1-2-2-2 Les canaux $\text{Ca}^{2+}$ de type T et L

Les cellules cardiaques contiennent au moins quatre types de canaux calciques, deux d'entre eux sont exprimés à la membrane<sup>(20;21)</sup>, les deux autres, notamment le canal de relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  et le récepteur  $\text{IP}_3$  sont exprimés dans des membranes internes responsables de la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire<sup>(22)</sup>. Les canaux calciques de type L,  $I_{\text{Ca,L}}$  (pour large ou longue durée) se trouvent dans toutes les cellules cardiaques et sont responsables du courant entrant lent. Les canaux de type T (pour tiny ou transitoire) semblent exister dans plusieurs types de cellules mammifères cardiaques mais sont plus importants chez le rat et le chat<sup>(23;24)</sup>, les cellules du nœud sinusal du lapin<sup>(25)</sup>, et les cellules de Purkinje canines<sup>(26)</sup>. Les propriétés de ces canaux de plus que leur distribution ont menés à l'hypothèse que les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T jouent un rôle dans l'activité pacemaker<sup>(24;25;27)</sup>. Des résultats ont montré que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  type T pourrait induire la contraction du muscle cardiaque par contre avec une cinétique plus lente que celles observée quand le  $\text{Ca}^{2+}$  entre via les canaux type L<sup>(28)</sup>. Il a aussi été suggéré que le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant via les canaux type T pourrait déclencher la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>(29)</sup>. Il existe une différence importante entre les deux types de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  exprimés à la membrane plasmique, et celle-ci est évidente dans la structure de la

partie extérieure du pore des canaux, puisque les canaux de type T ne lient pas les dihydropyridines.

### 1-2-2-3 Propriétés biophysiques

Les relations courant voltage ont une forme de cloche pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T et L. Le potentiel de sommet du type L est entre -10 et +20 mV. Le canal de type T atteint son sommet à approximativement 30 mV plus négatif que les canaux type L<sup>(23;26;30)</sup>. La densité du courant type T est approximativement un tiers à une demie de celle du courant de type L<sup>(31)</sup>.

La dépendance en voltage de l'activation et l'inactivation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L est très semblable entre différentes espèces<sup>(20)</sup>. Le voltage auquel la moitié des canaux de type L sont activés ( $V_{1/2}$ ) est à peu près -10 mV et son facteur de pente ( $k$ ) -6 mV, tandis que le  $V_{1/2}$  est de -30 mV et le  $k$  de 6 mV pour l'inactivation. Ceci est très différent des valeurs pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T, puisque le  $V_{1/2}$  d'activation est généralement 20 à 40 mV plus négatif et pour l'inactivation il est approximativement -70 mV avec un  $k$  de 4 à 6 mV.

L'inactivation de  $I_{\text{CaL}}$  serait dépendante du temps. La décadence du courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L proche du voltage maximal a été approximée avec des courbes mono- et bi-exponentielles<sup>(32;33)</sup>, et une composante ultra-lente fut observée dans le tissu cardiaque<sup>(34)</sup> et les myocytes isolés<sup>(35;36)</sup>. En général, la dépendance des constantes d'inactivation de  $I_{\text{CaL}}$  sur le voltage a un profile en forme de « U » avec son apex proche du voltage maximal<sup>(35-38)</sup>.

L'inactivation de  $I_{Ca}$  est aussi médiée par la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  ( $Ca_i^{2+}$ ). Le phénomène de l'inactivation induite par le  $Ca_i^{2+}$  fut découvert dans plusieurs types de cellules<sup>(20)</sup> suite à sa découverte dans les *Paramécies* en 1980<sup>(39)</sup>. Dans le tissu cardiaque mammifère l'inactivation de  $I_{Ca}$  est dictée par les mécanismes de dépendance sur le temps et le  $Ca_i^{2+}$ <sup>(20)</sup>. Dans l'oreillette humaine, l'inactivation médiée par le  $Ca_i^{2+}$  est plus importante que la composante dépendante du voltage<sup>(40)</sup>. À des potentiels correspondants au plateau (0 à +20 mV), la composante  $Ca^{2+}$ -dépendante est responsable pour approximativement 60% de l'inactivation totale durant des pulses de longueur du potentiel d'action<sup>(40)</sup>. Le domaine moléculaire responsable de l'inactivation  $Ca^{2+}$ -dépendante est sans doute la région « EF » caractérisée par le motif hélice-boucle-hélice, pouvant lier le  $Ca^{2+}$ , à proximité de l'entrée de la voie de conduction du canal<sup>(41)</sup>. Contrairement à  $I_{CaL}$ , l'inactivation du canal de type T ne diffère pas dépendant de l'espèce d'ion portant la charge, ce qui suggère que ce dernier n'est pas inactivé par le  $Ca_i^{2+}$ <sup>(41)</sup>.

### 1-2-3 Le courant activé par l'hyperpolarisation ( $I_f$ )

Décrit en 1976 dans le nœud sinusal du lapin<sup>(42)</sup>,  $I_f$  est présent dans les cellules de Purkinje<sup>(43)</sup>, de l'oreillette<sup>(44)</sup>, du nœud auriculo-ventriculaire<sup>(45;46)</sup>, et ventriculaires<sup>(47)</sup>. Le courant  $I_f$  est non-sélectif et conduit par les ions  $Na^+$  et  $K^+$ . De plus, il peut être bloqué par des ions de  $Cs^+$ .  $I_f$  est normalement activé par l'hyperpolarisation à des potentiels en dessous de -35 à -40 mV dans le nœud sinusal<sup>(43)</sup>, approximativement -85 mV dans les myocytes de Purkinje, et -120 mV dans les myocytes ventriculaires adultes. Puisque le potentiel de réversion de  $I_f$  est aux environs



de -20 mV, le courant est dirigé vers l'intérieur de la cellule à des potentiels diastoliques et donc il exerce un effet dépolarisant dans les cellules pacemakers suite à la repolarisation du potentiel d'action. Il joue aussi un rôle important dans la modulation du rythme cardiaque en réponse aux transmetteurs du système nerveux autonome<sup>(48)</sup>. Plusieurs études montrent que le courant  $I_f$  est un contributeur important à l'activité pacemaker du cœur intact<sup>(49)</sup>, et bien que les propriétés de  $I_f$  soient bien conçues pour la génération de l'activité pacemaker, la question se pose : existerait-il d'autres courants pacemaker?<sup>(50)</sup>

### 1-2-3-1 Base moléculaire

Les déterminants moléculaires de  $I_f$  furent élucidés en 1997 dans le cerveau de souris adultes<sup>(51-54)</sup>. Les courants pacemaker sont formés de membres de la famille (HCN) de protéines activées par l'hyperpolarisation et peuvent interagir avec les nucléotides cycliques. Le tissu cardiaque exprime HCN1, HCN2 et HCN4<sup>(55;56)</sup>. Aucune des sous-unités n'est capable de reproduire le courant  $I_f$  endogène à elle seule. Il a été décrit que l'hétéromérisation de HCN1 avec HCN2<sup>(57)</sup> et avec HCN4<sup>(48)</sup> produit un courant ayant des caractéristiques (cinétiques d'activation et sensibilité à l'AMPC) plus semblables au courant  $I_f$  endogène que celui produit par l'homomérisation de chacune des sous-unités.

## 1-3 Les courants repolarisants

Une des caractéristiques clé de l'activité électrique dans toutes les régions du cœur est celle de la repolarisation lente du potentiel d'action. La durée du potentiel d'action nerveux et du muscle squelettique est typiquement 2 à 10 ms et est relativement indépendante de la fréquence de stimulation. Tandis que dans le cœur mammifère, la durée du potentiel d'action peut varier entre 200 à 500 ms<sup>(58)</sup>. La longueur caractéristique du potentiel d'action est majoritairement déterminée par les courants repolarisants.

### 1-3-1 Les canaux potassiques

L'attention portée aux canaux potassiques est largement due à leur importance fondamentale dans l'initiation et la modulation de la repolarisation du potentiel d'action, en agissant en tant que substrats pour le contrôle neuromodulateur de la fonction cardiaque et aussi en servant de cible pour les agents antiarythmiques. Les canaux potassiques représentent la classe la plus diversifiée de tous les canaux du cœur. Ces canaux peuvent être classifiés dans quatre familles en se basant sur leurs propriétés fonctionnelles et biophysiques : (i) Les courants potassiques transitoire ou de type A; tel que  $I_{to}$ , (ii) les courants à rectification retardée; notamment  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ , (iii) les courants à activation ultrarapide à rectification retardée;  $I_{Kur}$ <sup>(59)</sup>, (iv) les courants entrants à rectification incluant;  $I_{K1}$ ,  $I_{KACH}$  et  $I_{KATP}$ .

### 1-3-1-1 Le courant $K^+$ transitoire sortant ( $I_{to}$ )

Le courant transitoire sortant  $I_{to}$  s'active et s'inactive rapidement en réponse à la dépolarisation du myocarde (<sup>4;60</sup>). Des études ont démontré que  $I_{to}$  était la somme résultante de  $I_{to1}$  et de  $I_{to2}$ . La première composante a été identifiée comme étant le courant potassique 4-AP sensible(<sup>61-63</sup>), calcium indépendant, et la deuxième le courant chlorique activé par le calcium mais 4-AP insensible(<sup>63-65</sup>).  $I_{to1}$  (simplement  $I_{to}$  pour raison de clarté) a été caractérisé dans les cellules du ventricule cardiaque chez le chat (<sup>66</sup>), le chien (<sup>67</sup>), la souris (<sup>68</sup>), le rat (<sup>69;70</sup>) et chez l'homme (<sup>71-74</sup>). De plus, il a été trouvé dans les oreillettes de chien (<sup>75</sup>), de rat (<sup>76;77</sup>), de souris (<sup>78;79</sup>) et chez l'homme (<sup>71;80-82</sup>).

#### 1-3-1-1-1 Rôle physiologique

$I_{to}$  est responsable de la repolarisation initiale (phase 1) du potentiel d'action et détermine la hauteur du plateau du potentiel d'action, ainsi, influençant l'activation d'autres courants qui contrôlent la repolarisation, plus spécifiquement le courant calcique de type L ( $I_{CaL}$ ) et les courants retardés à rectification ( $I_K$ ). Ce phénomène provoque l'effet « spike » et « dome », qui est attribué aux cinétiques rapides de l'activation et l'inactivation(<sup>83;84</sup>), dans le potentiel d'action observé (figure 1) dans les cellules de l'épicarde et du mi-myocarde mais non de l'endocarde du ventricule(<sup>67</sup>). Des différences régionales dans la morphologie du potentiel d'action sont en partie dues à l'hétérogénéité de  $I_{to}$ (<sup>85-87</sup>). Une diminution de  $I_{to}$  doit contribuer au prolongement de la durée du potentiel d'action durant la défaillance cardiaque(<sup>88;89</sup>).

### 1-3-1-1-2 Différences régionales

Il existe des différences significatives dans la densité et les cinétiques de  $I_{to}$  dans différentes espèces et régions du cœur de la même espèce. Chez l'homme, le lapin et le rat, la densité de  $I_{to}$  est plus élevée dans l'oreillette que dans les myocytes du ventricule<sup>(77;83;90;91)</sup>. Tandis que chez la souris, par exemple, la tendance est justement le contraire<sup>(79)</sup>. Dans le ventricule canin, la densité de  $I_{to}$  a été reportée comme étant plus haute dans les cellules de l'épicarde et du mi-myocarde du côté droit que du côté gauche<sup>(92;93)</sup>. L'hétérogénéité transmurale de la densité de  $I_{to}$  a été démontrée comme étant la cause de la différence transmurale de la morphologie du potentiel d'action dans le ventricule gauche du chien<sup>(85;87)</sup> et le ventricule droit humain<sup>(86)</sup>. Il y a aussi plusieurs études qui ont montré que  $I_{to}$  dans les myocytes de l'épicarde a une densité maximale plus élevée et une cinétique de rétablissement plus rapide que dans les myocytes de l'endocarde ventriculaire gauche chez l'homme<sup>(72;94)</sup> et le chien<sup>(87;95)</sup>. La composante rapide de  $I_{to}$  a une plus basse densité de courant dans le ventricule droit du côté septal que du côté de la paroi libre<sup>(70)</sup>.

### 1-3-1-1-3 Composantes de $I_{to}$

Deux composantes biophysiques de  $I_{to}$  ont été identifiées : la composante rapide ( $I_{to,f}$ ) et la lente ( $I_{to,s}$ )<sup>(68;70;96-99)</sup>. Les propriétés de la composante rapide suggèrent que celle-ci est composée des sous unités Kv4.2 et Kv4.3<sup>(4)</sup>. La composante lente a elle aussi été caractérisée (différenciée par son rétablissement de l'inactivation 20 fois plus lent que celui de  $I_{to,f}$ ) dans l'oreillette du lapin<sup>(83;97;100)</sup> et le ventricule de souris<sup>(68)</sup>.

Les taux d'inactivation et de rétablissement de  $I_{to}$  sont significativement plus lents dans les cellules isolées de l'endocarde à comparer à celle de l'épicarde, ce qui suggère que la base moléculaire qui encode ces deux canaux sont des entités distinctes<sup>(96)</sup>. Brahmajothi et ses collaborateurs ont démontré que chez le furet les sous unités Kv4.2 et Kv4.3 étaient majoritairement exprimés dans les myocytes de prélevés de l'épicarde du ventricule gauche que dans les cellules de l'endocarde et la sous unité Kv1.4 était principalement exprimée dans les cellules de l'endocarde<sup>(96)</sup>. Cette hétérogénéité d'expression n'est surtout pas mutuellement exclusive, les composantes rapides et lentes sont retrouvés dans plusieurs espèces et dans les mêmes régions tissulaires, c'est leur importance relative qui donne à une région quelconque ses propriétés caractéristiques<sup>(4)</sup>.

#### **1-3-1-1-4 Bases moléculaires de $I_{to}$**

Il a été décrit que les sous unités Kv4.2 et Kv4.3 encodent la composante rapide  $I_{to,f}$ , tandis que la composante lente  $I_{to,s}$  est encodée par Kv1.4<sup>(4)</sup>. Ces deux espèces diffèrent dans leurs cinétiques d'inactivation. La sous unité Kv4.3 a été déterminé comme étant la base moléculaire du courant transitoire sortant dans le ventricule humain<sup>(97;101)</sup>, et du chien<sup>(102)</sup>. Ces sous unités sont exprimés à des niveaux variables dans le myocarde<sup>(103)</sup>. La quantité d'ARNm de Kv4.3 diminue durant la défaillance cardiaque et cette réduction est associée à la réduction de la densité du courant  $I_{to}$ , indiquant que la régulation en baisse de ce courant se fait, au moins en partie, durant la transcription<sup>(4;101;104)</sup>. Par contre, la sous unité Kv1.4 représente  $I_{to}$  de l'endocarde humain<sup>(4;72)</sup>. L'expression, dans un système hétérologue d'expression, de Kv4.3, Kv1.4 ou des deux ensemble ne reproduit pas les propriétés observées du courant  $I_{to}$  endogène<sup>(4;60;72)</sup>.

Quand la sous unité  $\beta$ , KChIP2 est coexprimée avec Kv4.3, elle augmente la densité du canal à la surface de la membrane et, par conséquent, l'amplitude du courant  $I_{to}$ , ralentit l'inactivation, accélère le recouvrement post-inactivation, et déplace la courbe de l'inactivation à 50% ( $V_{1/2}$  de l'inactivation) à des potentiels plus positifs (<sup>105;106</sup>). Ainsi, les caractéristiques de Kv4.2/KChIP2 ressemblent de plus près celles de  $I_{to}$ . Dans le ventricule humain, l'ARNm de KChIP2 est 25 fois plus abondant dans l'épicaarde que dans l'endocarde et ceci mime le gradient d'expression, tandis que l'ARNm de Kv4.3 est exprimé à des niveaux équivalents à travers le ventricule. Donc la régulation transcriptionnelle du gène KChIP2 est la déterminante primaire de l'expression de  $I_{to}$  dans le ventricule (<sup>107</sup>). Dans les fibres de Purkinje humaines, la sous unité responsable de l'expression du courant  $I_{to}$  est Kv3.4, puisque lorsque exprimé dans des systèmes d'expression, les propriétés de cette sous unité sont plus semblables à celles de  $I_{to}$  endogène des cellules des fibres de Purkinje(<sup>108-112</sup>).

### 1-3-1-1-5 Propriétés biophysiques

L'enregistrement macroscopique de  $I_{to}$  démontre que sa relation courant-voltage est linéaire. La conductance du canal unitaire dans les myocytes de l'oreillette et du ventricule varie de 4 à 20 pS quand la concentration de potassium externe ( $[K^+]_o$ ) est de 5.4 mM(<sup>44;62;113</sup>), et de 20 pS dans une solution de 75 mM  $[K^+]_o$  dans les fibres de Purkinje de mouton(<sup>44;114</sup>).

L'activation de  $I_{to}$  est un processus relativement rapide, dépendant du voltage. Les constantes de temps d'activation maximale sont de l'ordre de millisecondes, celles-ci semblent être sensible au voltage et diminuent avec l'augmentation de la dépolarisation.

Le seuil d'activation varie entre -40 et 0 mV, et le  $V_{1/2}$  varie entre -12 et +22 mV<sup>(82;100;115;116)</sup>.

Plusieurs études décrivent la dépendance en voltage de l'inactivation à l'équilibre de  $I_{to}$  par une courbe Boltzmann. Le  $V_{1/2}$  de l'inactivation varie entre -85 et -14 mV<sup>(82;117)</sup>. Le seuil d'inactivation a été décrit dans la littérature et plusieurs différences en ressortent<sup>(118)</sup>. La progression de l'inactivation de  $I_{to}$  a été décrite<sup>(61;100)</sup> par une fonction monoexponentielle dans le ventricule de l'homme<sup>(72)</sup> et par une biexponentielle dans le cœur de lapin<sup>(83;100)</sup>. Les constantes d'inactivation de la phase rapide sont généralement dans l'ordre de dizaines de millisecondes à une température de 37°C, tandis que les constantes de temps de la composante lente sont de l'ordre de centaines de millisecondes<sup>(118)</sup>.

La plus grande variabilité dans le gating de  $I_{to}$  est dans les cinétiques de réactivation. Le rétablissement de  $I_{to}$  suivant son inactivation a été décrit comme étant un processus mono- et bi-exponentiel<sup>(100)</sup>. Des études antérieures ont démontré que cette cinétique peut varier de rapide (ordre de 10-100 ms) dans le ventricule de rat, et le ventricule et l'oreillette de l'homme<sup>(72;80;115)</sup>, à lent (ordre de centaines de millisecondes allant jusqu'à 1 seconde) dans l'oreillette de lapin, et dans le ventricule de lapin et de chien<sup>(80;95;100)</sup>. D'autres études ont montré des différences régionales dans les cinétiques de myocytes ventriculaires de différentes régions du cœur. Ceci serait du à l'hétérogénéité de  $I_{to}$  à travers le cœur (voir plus haut).

### 1-3-1-1-6 Propriétés pharmacologiques de $I_{to}$

Deux syndromes congénitaux de la mort subite cardiaque : le syndrome du long QT (LQTS) et le syndrome de Brugada ont différentes étiologies, par contre, des arythmies mortelles observées dans ces deux syndromes pourraient naître due à l'amplification des hétérogénéités électriques intrinsèques<sup>(119)</sup>. Ces mêmes mécanismes seraient responsables des arythmies dans une variété d'autres cardiopathologies allant de l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (inculquant des mécanismes reliés au LQTS) à l'ischémie et l'infarctus (mécanismes reliés au syndrome de Brugada)<sup>(119)</sup>.  $I_{to}$  n'est pas considérée comme une cible stratégique pour la découverte de nouveaux agents antiarythmiques. Par contre, plusieurs agents antiarythmiques ont des effets sur  $I_{to}$  et ces effets varient dépendant du tissu ou de la région cardiaque étudiée.

### 1-3-1-2 Le courant sortant retardé à rectification ( $I_K$ )

Noble et Tsien ont décrit le courant retardé à rectification<sup>(120)</sup>. Dans les fibres de Purkinje, les courants sortants dépendants du temps sont activés au cours du plateau du potentiel d'action. Le terme « courant retardé » est né du fait que les conductances de ces canaux s'activent lentement et avec un bref délai comparé à l'activation rapide des courants  $Na^+$  et  $Ca^{+2}$ . Depuis, des courants  $I_K$  ont été caractérisés chez le chien<sup>(75;121-123)</sup>, le chat<sup>(124)</sup>, le rat<sup>(69;76)</sup>, le lapin<sup>(125-127)</sup>, la souris<sup>(68;79;128-130)</sup> et chez l'homme<sup>(131-134)</sup>.



### 1-3-1-2-1 Rôle physiologique

$I_K$  contribue à la phase 3 du potentiel d'action des myocytes auriculaires, et ventriculaires et des fibres de Purkinje. On croit aussi qu'il pourrait moduler l'activité pacemaker par son déclin de conductance à des voltages diastoliques<sup>(135-140)</sup>. La distribution hétérogène de  $I_{Ks}$  (composante lente; voir plus bas) dans différentes régions du cœur pourrait contribuer à l'hétérogénéité de la morphologie du potentiel d'action<sup>(122)</sup>. Il a été démontré, que les syndromes de long QT acquis et congénitaux sont associés avec une diminution de  $I_{Kr}$  ou  $I_{Ks}$ <sup>(141)</sup>.

### 1-3-1-2-2 Les composantes de $I_K$

Deux composantes ont été élucidées, en se basant sur les différences entre leur cinétique d'activation, leur dépendance sur le voltage et leur propriété de rectification (120;142), comme composantes principales du courant  $I_K$ . Au début de années 1990, une étude a démontré qu'une composante était sensible à E-4031 et s'active rapidement, et l'autre était insensible à E-4031 et s'active plus lentement<sup>(143;144)</sup>.  $I_K$  peut être disséqué en deux composantes :  $I_{K,rapide}$  ( $I_{Kr}$ ), le  $I_{K,slow}$  ( $I_{Ks}$ :lent). On les distingue par leurs différences pharmacologiques et électrophysiologiques<sup>(144)</sup>.

#### 1-3-1-2-2-1 La composante rapide ( $I_{Kr}$ )

$I_{Kr}$  s'active et s'inactive rapidement, à des potentiels plus négatifs que  $I_{Ks}$  et possède une rectification vers l'intérieur très marquée<sup>(145)</sup>. Cette rectification joue un

rôle important durant la repolarisation du potentiel d'action où il devient inactivé (ouvert mais non conduisant). Lorsque la membrane revient à des voltages plus négatifs, ce canal fait la transition rapide de son état inactivé à son état ouvert et conduit plus de courant ce qui fait repolariser la cellule encore plus rapidement (<sup>146</sup>).

### 1-3-1-2-2-1-1 Base moléculaire

Le courant  $I_{Kr}$  est formé par la sous unité  $\alpha$  HERG (*human ether-a-go-go related gene*) qui est encodée par KCNH2(<sup>147</sup>). Par contre  $I_{Kr}$  et HERG diffèrent remarquablement l'un de l'autre quand ces sous unités sont introduites dans un système hétérologue d'expression(<sup>148;149</sup>). La sous unité  $\beta$  nommé MiRP1 (encodée par KCNE2), agit comme modulateur de plusieurs aspect du courant  $I_{Kr}$  notamment : son gating, sa régulation par la concentration externe d'ions  $K^+$  et la conductance en canal unitaire (13 à 8 pS)(<sup>148;149</sup>), quand ces deux protéines sont exprimés dans des systèmes hétérologues d'expression tels que les ovocytes de Xénopes, les cellules mammifères dites COS et HEK (<sup>150</sup>). Cette hétéromérisation a tendance à déplacer la courbe d'activation de HERG vers des potentiels plus positifs et accélérer le taux de désactivation ainsi que médier l'effet direct de stimulation par l'AMPc sur les canaux HERG/KCNE2. L'interaction entre HERG et une deuxième sous unité  $\beta$  nommée minK (encodée par KCNE1) a été décrite comme augmentant l'amplitude du courant HERG dans des cellules HEK293(<sup>151</sup>). La contribution hétérogène de  $I_{Kr}$  à la repolarisation du potentiel d'action peut être importante pour la fonction normale du cœur (<sup>152;153</sup>), par contre, des changements hétérogènes à ce courant dans des conditions pathologiques peuvent

accentuer la dispersion de la repolarisation et la période réfractaire dans le cœur, menant à la proarythmie (<sup>154;155</sup>).

### **1-3-1-2-2-1-2 Propriétés pharmacologiques de $I_{Kr}$**

$I_{Kr}$  est sélectivement bloqué par la dofétilide (<sup>156</sup>), le E-4031, le sotalol et le lanthanum (<sup>143;144</sup>). Les méthanosulfanilides bloquent  $I_{Kr}$  du côté intracellulaire de la membrane (<sup>157</sup>). Ce bloc se produit primordialement dans la configuration ouverte du canal (<sup>158</sup>). La dissociation entre la drogue et le canal se produit d'une manière lente et est généralement incomplète à des potentiels négatifs (<sup>156</sup>). Ce phénomène mène à une occlusion du site de liaison pour la drogue et empêche la liaison d'autres molécules de la drogue au pore (<sup>159;160</sup>). Le bloc de HERG (l'isoforme humaine) diffère remarquablement comparé au bloc d'autres canaux potassiques voltage dépendants (Kv), puisque ceux-ci ne partagent pas un large vestibule unique au HERG. Mitcheson et collaborateurs ont montré que des séquences spécifiques dans le domaine transmembranaire S6 et l'hélice du pore de HERG sont responsables pour son bloc particulier, avec deux résidus aromatiques formant des points de contact pour les bloqueurs liant la voie de conduction (<sup>161</sup>). La plupart des agents antiarythmiques de classe III présentement disponibles sont des inhibiteurs de  $I_{Kr}$  et sont associés à un potentiel dangereux de syndrome QT long et une proarythmie manifestée en forme de torsades de pointes (TdP) (<sup>162</sup>), qui peut mener à la fibrillation ventriculaire et à la mort subite. Typiquement, les inhibiteurs de  $I_{Kr}$  prolongent la durée du potentiel d'action à des taux de stimulation plus lent (<sup>163-167</sup>), un phénomène appelé dépendance inverse à l'usage (reverse use dependence). Cette propriété minimise l'efficacité de ces drogues à

des taux de stimulation rapides observés durant les arythmies, et puis, effectivement, réduit l'habilité de ces drogues à mettre un terme aux tachyarythmies telle que la fibrillation auriculaire (<sup>168</sup>). Mais leurs effets promoteurs de TdP et de la mort subite sont les raisons principales pour laquelle on ne se fit plus au bloc de HERG comme mécanisme viable pour contrer la fibrillation.

### **1-3-1-2-2-2 La composante lente ( $I_{Ks}$ )**

#### **1-3-1-2-2-2-1 Base moléculaire et rôle physiologique**

La composante lente du courant sortant retardé à rectification ( $I_{Ks}$ ) est encodée par les produits de *KCNQ1* et de la sous unité auxiliaire *KCNE1* notamment KvLQT1 et minK, respectivement (<sup>169;170</sup>).  $I_{Ks}$  s'active à des potentiels plus positifs que  $I_{Kr}$  (<sup>143;146</sup>).  $I_{Ks}$  joue un rôle important dans la repolarisation ventriculaire (<sup>171</sup>) et joue un rôle restreint dans la fonction de l'oreillette et le nœud sinusal(<sup>171</sup>). La hauteur du plateau ventriculaire du potentiel d'action résulterait en plus de l'activation de  $I_{Ks}$ .  $I_{Ks}$  semble être particulièrement important comme composante de réserve de repolarisation, quand le courant sortant est réduit ou quand il y a augmentation du courant entrant, par exemple lors du bloc de  $I_{Kr}$  et de stimulation  $\beta$ -adrénergique(<sup>172;173</sup>).  $I_{Ks}$  pourrait être une cible intéressante pour des agents antiarythmiques, par contre son étude est rendue difficile puisqu'elle est limitée par les manques de bloqueurs spécifiques.

### 1-3-1-2-2-2-2 Pharmacologie de $I_{Ks}$

Le dérivé du chromanol 293B bloc les courants exprimés par minK et non pas ceux exprimés par HERG dans le système d'ovocytes de Xénopes. Dans les myocytes ventriculaires de cochon d'Inde, le bloc de  $I_{Ks}$  avec le chromanol 293B prolonge la durée du potentiel d'action d'une manière indépendante de la fréquence, par contre dans les myocytes ventriculaires de lapin, le bloc de  $I_{Ks}$  se produit d'une manière inversement dépendante à la fréquence comme se fait le bloc de  $I_{Kr}$  dans les deux espèces (<sup>174;175</sup>). Chez le cobaye la haute densité de  $I_{Ks}$  en combinaison avec les cinétiques de désactivation lentes permettent l'accumulation de  $I_{Ks}$  à des rythmes cardiaques élevés due au fait que le temps ne permet pas la désactivation complète durant la période diastolique (<sup>175</sup>). Cette observation a mené à la notion que la prolongation de la durée du PA par des bloqueurs de  $I_{Ks}$  pourrait être importante non seulement dans la repolarisation ventriculaire mais aussi dans la fonction du pacemaker (<sup>176</sup>). Les résultats dans la littérature se contredisent, puisque des résultats obtenus avec des bloqueurs de  $I_{Ks}$  chromanol 293B ou L-735,821 donnent des prolongations variables du potentiel d'action (<sup>177</sup>). Cette contradiction pourrait être due aux différences régionales et entre différentes espèces de l'expression de  $I_{Ks}$ .

Les cinétiques lentes de ce courant sont une raison pour laquelle son bloc pourrait augmenter le risque des arythmies long QT acquises. Tandis qu'il pourrait y avoir des formes d'arythmies particulièrement dépendantes de l'activation de  $I_{Ks}$ , notamment; la forme familiale de la fibrillation auriculaire (<sup>178</sup>), pour laquelle le bloc de  $I_{Ks}$  pourrait être très utile.

Une série de bloqueurs très puissants et sélectifs de  $I_{Ks}$  les 3-acylamino-1,4 benzodiazépines, préviennent la fibrillation ventriculaire dans les modèles canins d'infarctus myocardiques, causant un léger prolongement du segment QT et une diminution de la dispersion réfractaire, un facteur de risque pour l'induction de l'arythmie (<sup>179</sup>). L'azimilide bloque  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  (<sup>180</sup>), et maintient l'effet classe III à des taux de stimulation élevés (<sup>181</sup>). L'azimilide, ou d'autres agents comme ce dernier qui ont une composante de bloc de  $I_{Ks}$ , pourraient prouver être des antiarythmiques intéressants avec une bonne mesure de sécurité, par contre ceci nécessite encore des études cliniques plus approfondies.

### 1-3-1-2-3 Propriétés biophysiques

Les deux composants de  $I_K$  sont dépendants du voltage et du temps, de plus ils sont très sélectifs aux ions  $K^+$ . Par contre ils diffèrent remarquablement l'un de l'autre dans certains aspects :

Premièrement, la relation courant-voltage de  $I_{Ks}$  est linéaire, tandis que celle de  $I_{Kr}$  démontre une rectification entrante marquée, avec des courants maximaux atteints aux environs de 0 mV, et une diminution de courant à des potentiels plus positifs(<sup>134;143;144</sup>). Deuxièmement, le seuil d'activation de  $I_{Kr}$  est -40 mV, qui équivaut à un niveau 20 mV plus négatif que celui de  $I_{Ks}$ (<sup>134;143;144</sup>). De plus le  $V_{1/2}$  et le facteur de la pente ( $k$ ) de l'activation sont -14 mV et 6.5 mV pour  $I_{Kr}$  et +19.9 mV et 12.7 mV pour  $I_{Ks}$ , respectivement, dans l'oreillette humaine(<sup>134</sup>). Ces valeurs sont semblables à celles observées dans le ventricule canin et humain. Leurs dépendances en voltage réagissent différemment en réponse à une diminution de la concentration externe de  $Ca^{2+}$ ; la courbe

d'activation de  $I_{Kr}$  devient plus négative, tandis que celle de  $I_{Ks}$  est observée à des potentiels plus positifs<sup>(182)</sup>. L'amplitude du courant  $I_{Ks}$  est augmentée en absence de  $K^+$  extracellulaire, tandis que l'effet contraire est observé pour  $I_{Kr}$ <sup>(183)</sup>. Leurs empreintes digitales déterminées par leur conductance en patch « canal-unitaire » sont d'approximativement 10-13 pS pour  $I_{Kr}$  et d'environ 3-5 pS pour  $I_{Ks}$ <sup>(126;127;184-187)</sup>.

Les cinétiques d'activation et d'inactivation de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  peuvent être décrites par des fonctions monoexponentielles avec des constantes de temps allant de 20 à 200 ms pour l'activation (+20 mV à -30 mV) et la désactivation (-70 mV à -20 mV), dans le cochon d'Inde<sup>(143;144)</sup>. L'activation de  $I_{Ks}$  est beaucoup plus lente que celle de  $I_{Kr}$ . Dans l'oreillette de l'homme, l'activation de  $I_K$  peut être décrite par une biexponentielle, tandis que l'activation de chacune des composantes est décrite par des monoexponentielles avec des constantes de temps allant de 100 ms à 400 ms de 0 à +60 mV pour  $I_{Kr}$  et de 600 ms à 1100 ms pour  $I_{Ks}$ <sup>(134)</sup>.

#### 1-3-1-2-4 Différences régionales

Les densités de  $I_{Kr}$  et de  $I_{Ks}$  varient énormément entre espèces, types cellulaires du myocarde et régions du cœur. Dans certaines préparations de quelques espèces il n'existe qu'une seule composante de  $I_K$ <sup>(126;188-190)</sup>. Les densités de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont approximativement 2 fois plus hautes dans les myocytes de l'oreillette que dans ceux du ventricule du cochon d'Inde<sup>(143;144)</sup>. La densité de  $I_{Ks}$ , chez le chien, dans les régions de l'épicarde et de l'endocarde est plus haute que dans les cellules du mi-myocarde<sup>(122)</sup>.

### **1-3-1-3 Le courant sortant ultra rapide retardé à rectification ( $I_{Kur}$ )**

#### **1-3-1-3-1 Rôle physiologique et base moléculaire**

Le courant ultra rapide retardé à rectification est formé par une variété de sous unités. Une variété d'ADNc ont été clonés qui encodent des sous unités de canaux potassiques portant le courant  $I_{Kur}$  quand ils sont exprimés dans des systèmes hétérologues. Ceux-ci incluent les clones reliés à la famille Shaker notamment, Kv1.2, 1.5, 2.1, et 3.1. Dans l'oreillette humaine il est composé primordialement par des sous unités de Kv1.5 (<sup>191</sup>), tandis que chez le chien par des sous unités de Kv3.1(<sup>123</sup>), par contre l'importance de ces résultats est présentement controversé (<sup>192</sup>). Des expériences ont été faites utilisant un oligonucléotide antisens dirigé contre Kv1.5, celles-ci ont montré que la densité de  $I_{Kur}$  était spécifiquement inhibée dans des myocytes auriculaires humains(<sup>59;116</sup>). De plus, les sous unités Kv1.5 s'assemblent avec des sous unités Kv $\beta$ 1.2 pour former  $I_{Kur}$  dans l'oreillette humaine(<sup>193</sup>).

#### **1-3-1-3-2 Propriété biophysiques**

$I_{Kur}$  est activé durant le plateau du potentiel d'action et doit jouer un rôle important dans la repolarisation auriculaire (<sup>116</sup>). Ce courant a un profile d'activation de deux ordres de magnitude plus rapide que  $I_{Kr}$ , avec une inactivation très lente (<sup>116;123</sup>), et pourrait être une cible intéressante dans la thérapie de la fibrillation auriculaire due à sa distribution presque exclusive dans l'oreillette (<sup>59;116;132;191</sup>).



La conductance du canal unitaire de  $I_{Kur}$  est approximativement 14 pS<sup>(194)</sup> et démontre une rectification entrante à des potentiels plus élevés que +30 mV. L'inactivation se produit d'une manière très lente et n'est pas observée dans des conditions physiologiques, de plus, le recouvrement post-inactivation se produit lui aussi très lentement mettant en évidence une dépendance, de ce canal, sur la fréquence<sup>(195)</sup>.

### 1-3-1-3-2 Propriétés pharmacologiques de $I_{Kur}$

La manière la plus claire de distinguer les différentes sous unités est leur profil pharmacologique et en particulier leur sensibilité aux bloqueurs de canaux potassiques tels que le 4-aminopyridine (4-AP), tétraéthylamonium (TEA), la dendrotoxine (DTX) et la charibdotoxine (CTX). Tous ces clones sont sensible au 4-AP mais diffèrent dans leur sensibilité : telle que la sous unité Kv3.1 est la plus sensible et la Kv2.1 est la moins sensible. Les sous unités Kv1.2 et Kv1.5 sont insensibles au TEA tandis que Kv2.1 est modérément sensible et Kv3.1 est très sensible au TEA.

Les agents antiarythmiques de classe III, qui ont pour effet principal de prolonger le potentiel d'action en bloquant les canaux  $K^+$ , sont très efficaces dans la thérapie de la fibrillation auriculaire. Le courant  $I_{Kur}$  est une cible importante par son expression exclusive à l'oreillette. Plusieurs des agents antiarythmiques ont des composantes de bloc du courant  $I_{Kur}$  <sup>(196-199)</sup>. Par contre ils ont également un effet sur d'autres canaux exprimés au niveau ventriculaire. Le bloc de ces canaux serait indésirable puisqu'il pourrait entraîner des risques proarythmiques. Des nouveaux bloqueurs sélectifs pour l'oreillette, tels que le S1185, S9947 et le S20951 prolongent fortement la période réfractaire de l'oreillette gauche <sup>(200)</sup>. Une des limitations de la valeur des bloqueurs de

$I_{Kur}$  est que cette approche remonte le niveau du plateau du potentiel d'action, un effet qui augmente  $I_{Kr}$  et limite toute prolongation de la durée du potentiel d'action<sup>(201)</sup>. Il a été suggéré que la forme du potentiel d'action est un déterminant important de l'effet prolongateur de l'inhibition de  $I_{Kur}$ , et la forme courte et triangulaire du potentiel d'action observée durant la fibrillation auriculaire est particulièrement susceptible à la prolongation par des bloqueurs de  $I_{Kur}$ <sup>(202)</sup>. Le bloc de ce courant engendre une prolongation importante du potentiel d'action auriculaire humain<sup>(116)</sup>, canin<sup>(123)</sup>, et de la souris<sup>(123;128)</sup>. Les propriétés pharmacologiques de  $I_{Kur}$  varient entre l'homme et le chien renforçant l'idée d'une base moléculaire distincte pour chacun des courants.

#### **1-3-1-4 Courant sortant à rectification entrante ( $I_{K1}$ )**

Durant le plateau du potentiel d'action cardiaque, la conductance membranaire totale tombe à des niveaux négligeables. Due à cet état de basse conductance, de minuscules changements ioniques peuvent avoir des effets profonds sur le déroulement de la repolarisation. Le mécanisme principal par lequel la conductance membranaire est réduite quand la cellule est dépolarisée est la dépendance au voltage du courant potassique de fonds, soit le courant sortant à rectification entrante.

##### **1-3-1-4-1 Rôle physiologique**

$I_{K1}$  est essentiel au maintien du potentiel de repos et au contrôle de l'excitabilité des cellules du myocarde. Ce canal laisse entrer les ions lorsque la cellule est hyperpolarisée mais empêche leur sortie durant la dépolarisation. Le fait que ce canal

puisse conduire facilement à des potentiels très négatifs permet à ce dernier de repolariser (fin de phase 3) la cellule et maintenir le potentiel de repos (phase 4) facilement sans trop épuiser la cellule durant les dépolarisations du potentiel d'action.

### 1-3-1-4-2 Base moléculaire

Depuis le clonage du premier Kir2<sup>(203)</sup> la sous unité Kir2.1 (originellement IRK1) est considérée comme la sous unité portant le courant  $I_{K1}$  cardiaque, puisque quand exprimée dans des systèmes hétérologues d'expression, ses propriétés sont très semblables à celles du courant endogène. Par contre, notre connaissance de la base moléculaire est limitée. Il existe plusieurs conductances associées à  $I_{K1}$ , notamment; 9, 21, 35 et 41 pS<sup>(204)</sup>. Au niveau de l'ARN messenger, Kir2.1 est la sous unité la plus abondante avec des concentrations, au niveau du ventricule de plus de dix fois celles de Kir2.2 et 2.3<sup>(205)</sup>. Malgré la détection au niveau cardiaque des sous unités Kir 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4, seul Kir 2.1, 2.2 et 2.3 semblent être exprimées dans les myocytes cardiaques<sup>(204;206-210)</sup>. La sous unité Kir2.1 est plus abondante au niveau du ventricule comparé à l'oreillette, tandis que le contraire est observé pour la sous unité Kir2.3. Les conductances en canal unitaire semblent varier durant le développement suggérant des changements basés sur le développement<sup>(211;212)</sup>. Quatre différentes conductances unitaires sont discernables dans les cellules de l'oreillette humaine, suggérant une hétérogénéité moléculaire<sup>(204)</sup>. Supprimant Kir2.1 à l'aide d'un oligonucléotide antisens dirigé contre cette sous unité a démontré qu'il y avait un courant résiduel dans les myocytes ventriculaires du rat, suggérant d'autres contributeurs à ce courant<sup>(213)</sup>. Dans des souris manquantes complètement le Kir2.1 au niveau génétique,  $I_{K1}$  est absent<sup>(394)</sup>.

Par contre, le « knock out » du Kir2.2 ne réduit le courant  $I_{K1}$  que de 50%<sup>(394)</sup>. Ces résultats suggèrent que la sous unité Kir2.1 est composante de la plupart des canaux  $I_{K1}$  dans la souris, tandis que les sous unités Kir2.2 sont moins présents mais tout de même important dans la formation de  $I_{K1}$  en formant un hétéromère avec Kir2.1 (Kir2.1-Kir2.2)<sup>(394)</sup>.

### 1-3-1-4-3 Propriétés pharmacologiques $I_{K1}$

Le barium ( $Ba^{2+}$ ) bloque  $I_{K1}$  d'une manière très efficace, avec une concentration inhibitoire ( $IC_{50}$ ) de 20  $\mu M$ <sup>(204)</sup>. Les bloqueurs de  $I_{K1}$  prolongent la durée du potentiel d'action de l'oreillette, du ventricule et du nœud auriculo-ventriculaire, ils sont également efficaces contre quelques tachycardies ventriculaires réentrantes<sup>(214)</sup>. De plus, les bloqueurs de  $I_{K1}$  induisent une dépolarisation de la membrane, un effet qui ralentit la vitesse de conduction due à l'inactivation voltage dépendante des canaux  $Na^+$  et qui prolonge l'intervall QT. Ces deux actions sont proarythmiques. À des taux élevés de battement de cœur, la concentration  $K^+$  et la densité de  $I_{K1}$  augmentent, ceci produit un raccourcissement de la durée du potentiel d'action. Dans ces conditions cet effet pourrait contrebalancer l'efficacité des bloqueurs  $I_{K1}$  de prolonger la durée du potentiel d'action.

## 1-4 D'autres courants repolarisants

### 1-4-1 Le courant potassique activé par l'acétylcholine ( $I_{KACH}$ )

#### 1-4-1-1 Rôle physiologique

Dans le tissu supraventriculaire, l'acétylcholine (ACh), relâchée durant la stimulation vagale produit l'activation de ces canaux par leur interaction avec le récepteur muscarinique M2<sup>(215)</sup>. Cette interaction a pour effet de réduire la fréquence cardiaque. Cette action est attribuée à l'habileté de l'ACh d'hyperpolariser la cellule en ouvrant les canaux potassiques sortant à rectification entrante  $I_{KACH}$ .

Une activité basale de ce canal a été observée en absence d'agoniste<sup>(216)</sup> et il a été suggéré que  $I_{KACH}$  pourrait agir comme courant sortant de fonds contribuant à la fonction pacemaker<sup>(217)</sup>.

#### 1-4-1-2 Base moléculaire

Les canaux  $I_{KACH}$  ont été caractérisés dans les cellules sinusales<sup>(218)</sup> et auriculaires<sup>(219)</sup> du lapin, chez l'homme et le cochon d'Inde<sup>(220)</sup>, le chien<sup>(221)</sup>, et les fibres de Purkinje<sup>(220;222)</sup>.

La famille de courants sortants à rectification entrante Kir3.x forme le canal  $I_{KACH}$ . Il y en a 5 membres Kir3.1 à 3.5<sup>(223)</sup>. Le canal  $I_{KACH}$  de l'oreillette est formé de deux sous unités Kir3.1 et deux sous unités Kir3.4<sup>(224)</sup>.

## 1-4-2 Le courant sensible à l'ATP ( $I_{KATP}$ )

### 1-4-2-1 Rôle physiologique et propriétés biophysiques

Le courant sensible à l'ATP ( $I_{KATP}$ ) est un courant à rectification entrante activé quand le niveau d'ATP cytosolique tombe à un niveau critique<sup>(225)</sup>. Donc des niveaux physiologiques d'ATP inhibe ce courant. Son rôle est un de protection contre le stress métabolique<sup>(226)</sup> en couplant le potentiel membranaire de la cellule à son état métabolique<sup>(227;228)</sup>. Ce canal ne s'ouvre que rarement en conditions physiologiques d'ATP, par contre, il s'ouvre presque constitutivement durant des périodes de déplétion des niveaux d'ATP intracellulaire.

La conductance du canal unitaire est de 70 à 90 pS à des potentiels positifs<sup>(220)</sup>. Et donc, la relation courant-voltage de  $I_{KATP}$  démontre une faible rectification à des potentiels positifs durant son activation, ce qui démontre que le canal persiste durant la durée du potentiel d'action et donc le long du cycle cardiaque complet<sup>(225;229;230)</sup>. Il a été aussi décrit que  $I_{KATP}$  est important dans l'effet cardioprotecteur contre le préconditionnement ischémique<sup>(231;232)</sup>.

### 1-4-2-2 Base moléculaire

Depuis sa première description,  $I_{KATP}$  a été caractérisé dans plusieurs types de cellules notamment; le cochon d'Inde<sup>(190;220;225;233-235)</sup>, l'homme<sup>(220)</sup>, le lapin<sup>(225)</sup>, et le rat<sup>(236;237)</sup>. Il a de plus, été trouvé dans les cellules pancréatiques  $\beta$ , le muscle squelettique, le système nerveux et le muscle lisse artériel<sup>(238)</sup>.

$I_{KATP}$  est formé de quatre sous unités Kir6.2 et quatre sous unités nommées récepteur à la sulfonylurée 2A (SUR2A)<sup>(227;228)</sup>. La sous unité Kir 6.2 confère l'inhibition par l'ATP<sup>(239)</sup>, et la sous unité SUR2A contient le site liant la molécule ATP<sup>(240)</sup>. Contrairement aux expériences « knock-out » du canal  $I_{KACH}$  celles sur des souris « knock-out » manquant la sous unité Kir6.2 n'exprimait plus de courant  $I_{KATP}$  endogène<sup>(241)</sup>.

# **CHAPITRE DEUXIÈME**

## **STRUCTURE DES CANAUX VOLTAGE- DÉPENDANTS CARDIAQUES**



## 2 Structure des canaux voltage dépendants cardiaques

Suite à une panoplie d'études, il est clair que les myocytes individuels expriment une quantité énorme de gènes codant des canaux ioniques et que même dans le cœur normal, il existe une hétérogénéité des caractéristiques électrophysiologiques importante. Plus récemment, le clonage de canaux ioniques et la façon dont leur structure est reliée à leur fonction nous a aidé à mieux comprendre l'origine des rythmes cardiaques normaux et anormaux et comment mieux entreprendre différentes thérapies utiles au niveau clinique.

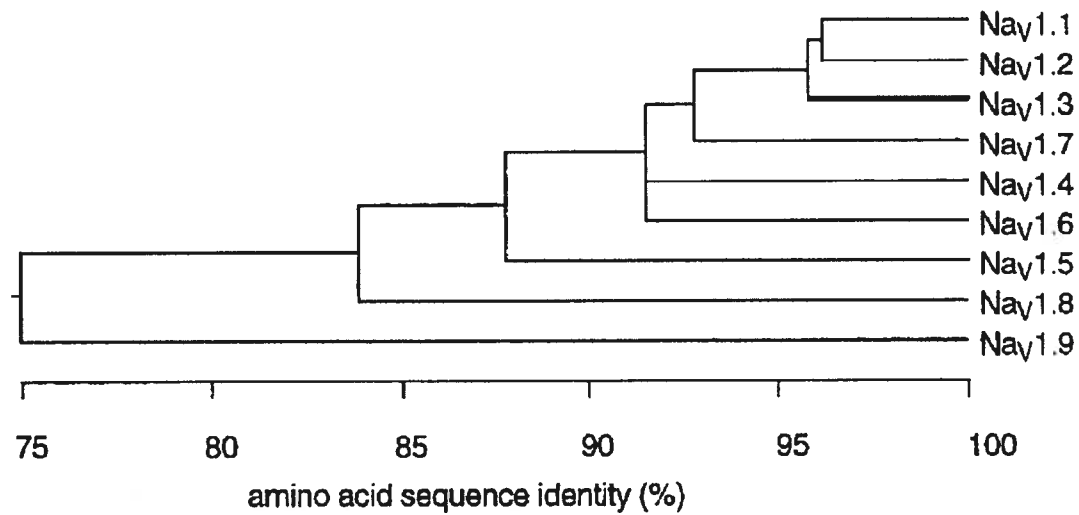
### 2-1 Le canal sodique ( $I_{Na}$ )

Les courants sodiques furent enregistrés, en premier lieu, par Hodgkin et Huxley<sup>(242)</sup>. En utilisant la méthode de voltage imposé, ils démontrèrent trois caractéristiques clés des canaux  $Na^+$ : (i) l'activation voltage dépendante, (ii) l'inactivation rapide, (iii) la conductance sélective aux ions  $Na^+$ <sup>(242)</sup>. Depuis, des canaux  $Na^+$  voltage dépendants ont été clonés d'une variété d'espèces et de tissus et partagent un degré remarquable d'homologie à l'ADNc original<sup>(243)</sup>. Dans le cœur humain le gène codant le canal  $Na^+$  est le *SCN5A*<sup>(244)</sup>. Quand ces ADNc sont introduits dans des systèmes d'expression hétérologue tels que les ovocytes de Xénopes ou un système mammifère, des courants entrants, possédant des caractéristiques semblables à celles du courant cardiaque endogène, sont observés.

## 2-1-1 Nomenclature

Les propriétés des canaux sodiques sont relativement semblables entre membre d'une même sous famille, ce qui n'est pas le cas pour les canaux potassiques et calciques. Pour éliminer toute confusion liée à leur nomenclature originale, une nomenclature plus organisée fut entreprise récemment<sup>(245)</sup>. Celle-ci est basée sur celle utilisée couramment pour nommer les canaux  $K_v$ <sup>(246)</sup>. Une nomenclature semblable a également été adoptée pour faire référence aux canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendants<sup>(247)</sup>.

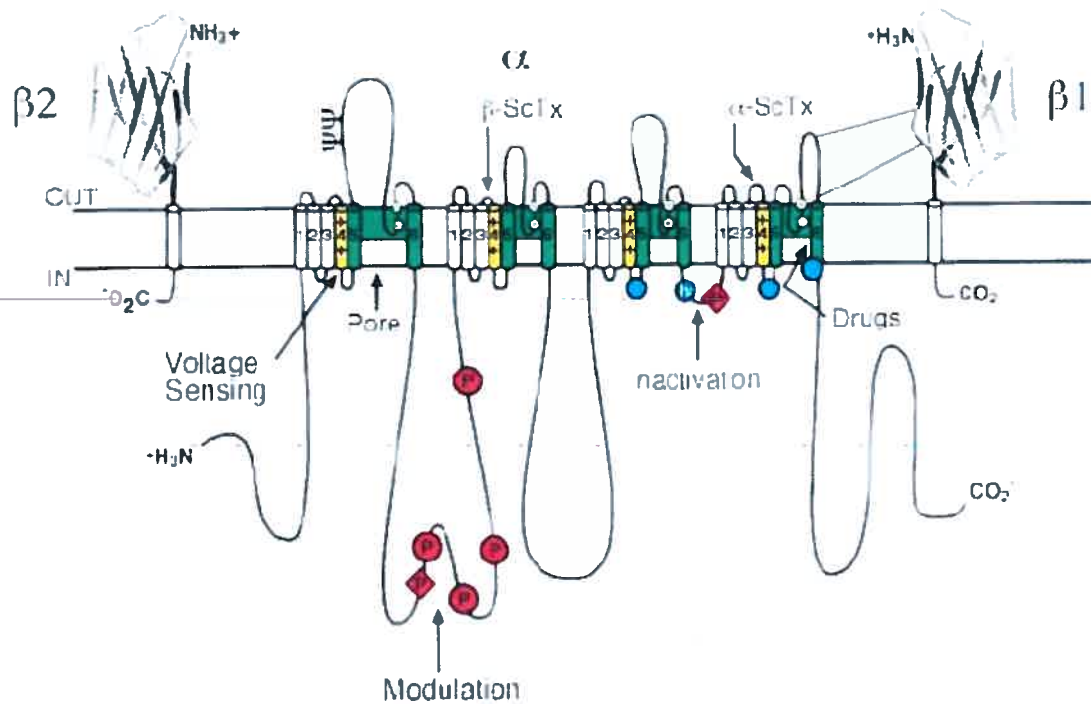
Pour les canaux sodiques, dans cette nomenclature, le nom consiste de l'ion principal passant par le canal ( $Na^+$ ) avec le régulateur physiologique principal (voltage) indiqué ( $Na_v$ ). Le chiffre suivant le régulateur principal indique la sous famille du gène (jusqu'à présent seulement  $Na_v1$ ), et en suite le chiffre indiquant l'isoforme spécifique du canal (e.g.,  $Na_v1.5$ ). Ce dernier chiffre indique l'ordre approximatif de la découverte de cette isoforme. Dans cette sous famille, neuf sous types ont été identifiés et ils partagent tous plus de 50% d'homologie dans les domaines transmembranaires et extracellulaires. La figure 3 démontre la haute homologie partagée par les membres de la sous famille  $Na_v1.x$ .



**Figure 3 :** Similarités de la séquence protéique des sous unités Nav1.1 à Nav1.9 des canaux sodiques voltage dépendants.<sup>(248)</sup>

### 2-1-2 Structure de la sous unité $\alpha$ de $I_{Na}$

La sous unité  $\alpha$  de  $I_{Na}$  consiste de quatre domaines (I-IV), liés ensemble par des segments intracellulaires. Chacun des domaines contient six hélices  $\alpha$  transmembranaires (S1-S6) et une boucle qui plonge dans la région transmembranaire entre les segments S5 et S6 et formant le pore (Figure 4).



**Figure 4** : Structure de la sous unité des canaux sodiques voltage dépendants. Schéma représentant les quatre domaines liés contenant leurs six segments transmembranaires. Illustrées aussi sont les sous unités  $\beta$  et les sites de glycosylation et de modulation de ces canaux.<sup>(248)</sup>

Le segment S4 dans chacun des quatre domaines contient 5 à 8 résidus chargés positivement, séparés par des intervals de trois acides aminés. Il est postulé que le segment S4 agit comme détecteur de voltage et se déplace en réponse à un changement de potentiel membranaire et donc entraînerait un changement de conformation de la protéine pour ainsi ouvrir le pore afin qu'elle puisse laisser passer des ions. Ce concept est supporté par des études utilisant la mutagenèse dirigée et l'expression de canaux mutants dans des systèmes hétérologues d'expression (249). La courte boucle

intracellulaire reliant les domaines III et IV sert de porte d'inactivation, se pliant dans le canal, bloquant ainsi le pore de l'intérieur durant une dépolarisation soutenue de la membrane.

Le pore du canal est formé par la région liant les segments S5 et S6 de chaque domaine. Les bloqueurs du pore, la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine, ont menés directement à la découverte de ce pore et au filtre de sélectivité<sup>(250)</sup>. Des analyses mutationnelles ont identifié un résidu dans le segment liant S5 et S6 du domaine I comme étant crucial pour la liaison de ces bloqueurs<sup>(251)</sup>. D'autres résidus semblables ont été trouvés dans des positions analogues des quatre domaines<sup>(252)</sup>. Deux anneaux (un interne et l'autre externe) sont formés par ces résidus. Les anneaux confèrent au canal sa sensibilité à la TTX et sa perméabilité sélective aux ions sodium. Ceci fut démontré plus profondément, car lorsque les résidus formant l'anneau interne (DEKA) furent remplacés par les résidus identifiés dans le filtre de sélectivité des canaux calciques (EEEE), les canaux Na<sup>+</sup> devenaient perméables aux ions Ca<sup>2+</sup><sup>(253)</sup>.

L'ensemble des canaux sodiques étudiés à ce jour partagent les propriétés de perméabilité et donc il est suggéré qu'ils ont tous un filtre de sélectivité en commun. Par contre, l'affinité de la TTX pour le canal sodique cardiaque est réduite de 200 fois suite au remplacement d'une tyrosine ou une phénylalanine, à une position de deux résidus en amont du premier résidu de glutamate du pore du domaine I des canaux du cerveau et du muscle squelettique, à une cystéine dans le canal cardiaque<sup>(254-256)</sup>. Donc la substitution d'un seul résidu confère un changement énorme dans la sensibilité de ces canaux aux bloqueurs du pore.

### 2-1-3 Structure de la sous unité $\beta$ de $I_{Na}$

La sous unité  $\alpha$  peut par elle-même produire un canal viable à la membrane mais ces canaux expriment une activation et une inactivation plus lentes qu'observées dans des cellules isolées. Par contre, deux sous unités auxiliaires  $\beta$ , qui en elles mêmes ne peuvent pas produire de canal sodique ont été clonées<sup>(12)</sup>. La coexpression de  $\alpha$  et  $\beta_1$  dans des ovocytes de Xénopes produit des changements remarquables au courant, notamment : une augmentation de l'amplitude, une augmentation du taux d'activation, et un plus rapide rétablissement de l'inactivation<sup>(257-260)</sup>. L'effet de la sous unité  $\beta_1$  est médié par un pli (ressemblant à celui d'une immunoglobuline) dans son domaine extracellulaire<sup>(261-263)</sup>. Cette sous unités est supposée, d'après des études utilisant différentes chimères, interagir avec la sous unité  $\alpha$  sur une boucle du coté extracellulaire du segment transmembranaire S6 du domaine IV<sup>(262;264)</sup>.

Une propriété surprenante de la structure des sous unités  $\beta$  du canal sodique est leur remarquable similarité avec la famille de molécules adhésives aux cellules (*cell adhesion molecule*). Ces molécules médient les interactions cellule-cellule. Cette similarité structurelle suggère une similarité fonctionnelle. Il a été démontré que les canaux  $Na^+$  et la sous unité  $\beta$  lient les protéines de la matrice extracellulaire ténascine-C et ténascine-R<sup>(265;266)</sup>.

La sous unité  $\beta_1$  cardiaque fut découverte<sup>(267;268)</sup>, par contre, il n'est pas encore clair si la sous unité  $\beta_1$  est nécessaire pour reconstituer le canal sodique cardiaque<sup>(12)</sup>.

### 2-2 Les canaux calciques

Les canaux calciques voltage dépendants agissent en tant que médiateur de l'influx de calcium en réponse à une dépolarisation membranaire et régulent plusieurs

processus intracellulaires tels que la contraction, la sécrétion, la neurotransmission et l'expression de gènes. Leur activité est essentielle au couplage de signaux électriques à la surface de la cellule et aux événements physiologiques intracellulaires.

Canal	Isoforme	Courant	Localisation	Antagonistes Spécifiques	Fonctions
Cav1.1	$\alpha 1S$	L	-Muscle squelettique	DHP PAA BTZ	-Couplage EC
Cav1.2	$\alpha 1C$	L	-Myocytes cardiaques -Cellules endocrines -Neurons	DHP PAA BTZ	-Couplage EC -Relâche hormonale -Régulation transcription -Intégration synaptique
Cav1.3	$\alpha 1D$	L	-Cellules endocrines -Neurons	DHP PAA BTZ	-Relâche hormonale -Régulation transcription -Intégration synaptique
Cav1.4	$\alpha 1F$	L	-Rétine	inconnu	-Relâche de neurotransmetteur des cellules rétinales
Cav2.1	$\alpha 1A$	P/Q	-Terminaux nerveux -Dendrites	$\omega$ -ATX	-Relâche de neurotransmetteur -Ca <sup>2+</sup> transitoire dendritique
Cav2.2	$\alpha 1B$	N	-Terminaux nerveux -Dendrites	$\omega$ -CTX	-Relâche de neurotransmetteur -Ca <sup>2+</sup> transitoire dendritique
Cav2.3	$\alpha 1E$	R	-Corps cellulaires -Dendrites -Terminaux nerveux	SNX-482	-Décharge répétitive
Cav3.1	$\alpha 1G$	T	-Myocytes cardiaques -Muscle squelettique -Neurons	Aucun	-Décharge répétitive -Pacemaker
Cav3.2	$\alpha 1H$	T	-Myocytes cardiaques -Neurons	Aucun	-Décharge répétitive -Pacemaker
Cav3.3	$\alpha 1I$	T	-Neurons	Aucun	-Décharge répétitive -Pacemaker

**Tableau I :** Classification, fonction physiologique et pharmacologie des canaux calciques Cav. PAA :phénylalkylamines, DHP : dihydropyridines, BTZ : benzothiazépines, ATX : agatoxine, CTX : conotoxine.

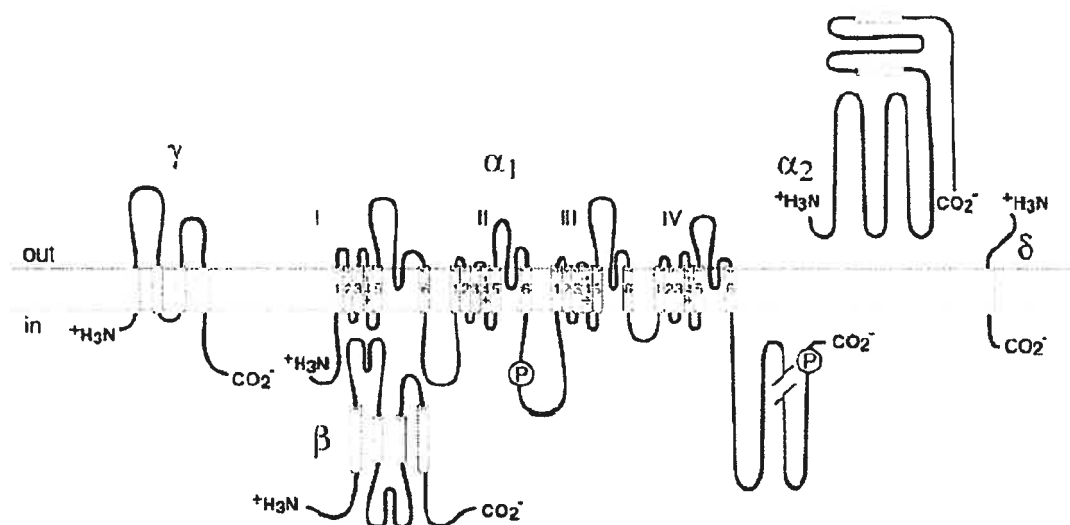


## 2-2-1 Nomenclature

L'étude des canaux calciques a adopté une nomenclature semblable à celle utilisée pour les canaux sodiques<sup>(247)</sup>(voir TABLEAU I).

## 2-2-2 Structure des canaux calciques

L'analyse des propriétés biochimiques, de glycosylation, et d'hydrophobicité mena à un modèle comprenant cinq sous unités distinctes encodées par plusieurs gènes (FIGURE 5)



**Figure 5** : Sous unités des canaux Ca<sub>v</sub>1. Composition et structure de la sous unité des canaux calciques(adapté de Catterall et al. 2000)<sup>(269;270)</sup>.

La purification initiale des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  démontra la présence des sous unités  $\alpha_1$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces expériences ont montré que les sous unités  $\alpha_1$  et  $\beta$  sont les substrats pour la phosphorylation protéique dépendante de l'AMPc (<sup>271;272</sup>). Une analyse plus détaillée révéla qu'il existait une sous unité additionnelle nommée  $\alpha_2\delta$  qui semble co-migrer avec la sous unité  $\alpha_1$  (<sup>273-276</sup>).

La sous unité la plus large de ce complexe est la sous unité  $\alpha_1$  et elle contient la voie de conduction, le détecteur de voltage, l'appareil de gating et les sites de régulation par des seconds messagers, drogues et toxines.

Tout comme la sous unité  $\alpha_1$  du canal  $\text{Na}^+$ , celle du canal  $\text{Ca}^{2+}$  est organisée en quatre domaines homologues I à IV, chacun contenant six segments transmembranaires S1 à S6 avec une boucle formant le pore entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. La boucle du pore, qui détermine la conductance, la sélectivité aux ions et le changement de trois acides aminés dans les domaines I, III et IV est suffisante pour convertir un canal sélectif au  $\text{Na}^{2+}$  à un sélectif au  $\text{Ca}^{2+}$ . Semblablement au canaux sodiques, un anneau de résidus détermine la sélectivité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , par contre, pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  il s'agit d'un anneau composé de quatre résidus de glutamate (EEEE) (<sup>253</sup>).

La sous unité  $\alpha_2$  contient plusieurs sites de glycosylation et plusieurs séquences hydrophobes (<sup>277</sup>), mais des études de biosynthèse indiquent que celle-ci est une protéine membranaire extracellulaire liée à la membrane par un lien bisulfure avec la sous unité  $\delta$  (<sup>278</sup>). Malgré l'existence de tant de sous unités la diversité pharmacologique et électrophysiologique des canaux calciques provient de la grande variété des sous unités  $\alpha_1$  (<sup>279</sup>). Ces sous unités récemment divisées en trois sous familles sont reliées par leur structure et fonction ( $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  et  $\text{Ca}_v3$ ). Les canaux de type L sont médiés par la famille  $\text{Ca}_v1$  (<sup>280-283</sup>) des sous unités  $\alpha_1$  (TABLEAU 1). Les canaux de type T sont

médiés par la famille  $Ca_v3$ <sup>(284)</sup>. Ces derniers n'ont qu'une homologie de moins de 25% au reste de cette famille.

### 2-2-3 Les canaux calciques de type L et T

Les canaux de type L et T possèdent des différences remarquables entre eux. Les canaux de type L requièrent une forte dépolarisation pour l'activation, ont une durée d'activation prolongée, et sont la cible des antagonistes dihydropyridines, phénylalkylamines et les benzothiazépines. Contrairement, les canaux de type T sont activés par des faibles dépolarisations, ils sont transitoires et ils ne sont pas affectés par les mêmes antagonistes.

Leur pharmacologie est très distincte. Les canaux  $Ca_v1$  sont la cible des bloqueurs de canaux calcium couramment employés dans la thérapie des maladies cardiovasculaires. Ces agents agissent à trois sites distincts, toutefois ils sont couplés allostériquement. Les phénylalkylamines entre dans le pore du côté intracellulaire du canal afin de le bloquer. Leur site récepteur est formé par des résidus du segment transmembranaire S6 des domaines III et IV, une propriété qui ressemble au site récepteur des anesthésiques locaux sur le canal  $Na^+$ <sup>(285-287)</sup>. Les dihydropyridines agissent comme activateurs ou inhibiteurs et par conséquent, on croit qu'ils agissent d'une manière allostérique pour ouvrir ou fermer le canal, plutôt que d'occlure le pore. Leur site récepteur inclut des résidus du segment S6 des domaines III, IV et du segment S5 du domaine III.

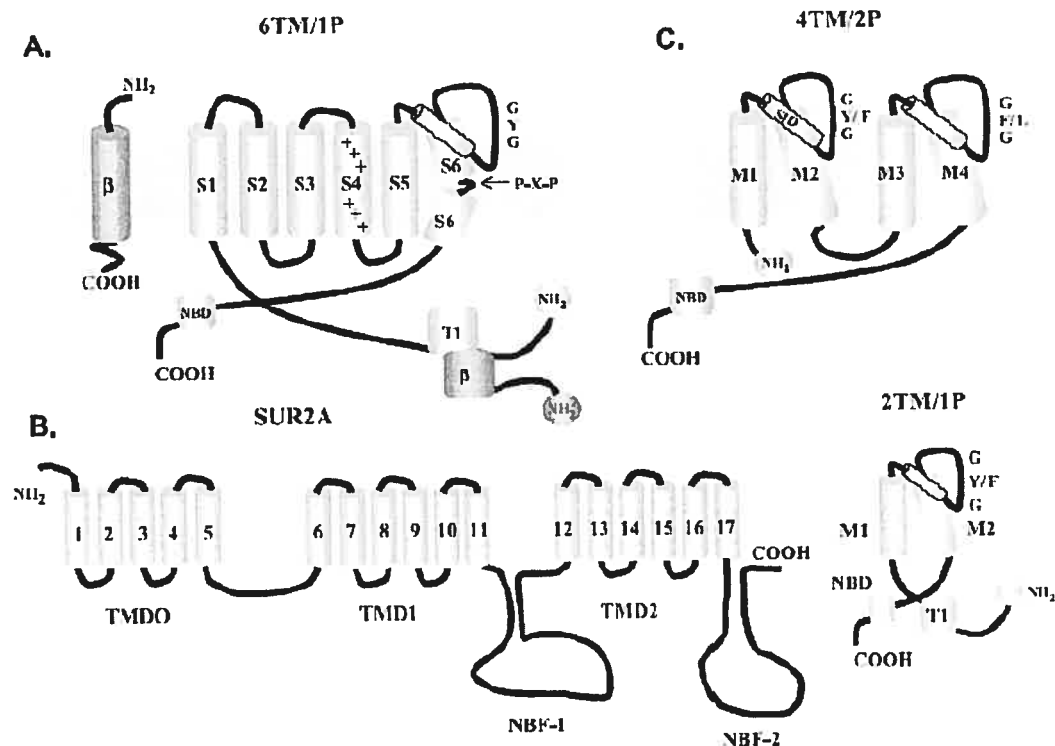
La famille  $Ca_v3$  des canaux calciques est insensible aux bloqueurs efficaces des deux autres familles et il n'y a pas d'agent pharmacologique utile qui bloquerait les

canaux de type T<sup>(288)</sup>. Le bloqueur mibéfradil, est un peu plus spécifique pour les canaux de type T que pour ceux de type L.

Parmi les dix différentes isoformes de la sous unité  $\alpha_1$ , seule  $\text{Ca}_v1.2$  ( $\alpha_1\text{C}$ ) est exprimée à des niveaux importants dans le muscle cardiaque, constituant plus de 80% des sous unités associées au canal  $\text{Ca}^{2+}$  type L<sup>(289)</sup>. L'isoforme  $\text{Ca}_v1.3$  ( $\alpha_1\text{D}$ ) est exprimé uniquement dans l'oreillette mais à des niveaux significativement moins élevés<sup>(290)</sup>. La diversité des canaux calciques est compliquée par le fait qu'il y a quatre isoformes de sous unités  $\beta$  ( $\beta_1$  à  $\beta_4$ ) qui sont exprimés dans le cerveau de mammifère, mais jusqu'à présent seule l'isoforme  $\beta_2$  est retrouvée en haute densité dans le muscle cardiaque<sup>(291)</sup>. L'association du complexe du canal  $\text{Ca}^{2+}$  de type L avec une sous unité  $\gamma$  cardiaque n'a pas encore été démontrée<sup>(285)</sup>.

### 2-3 Les canaux potassiques

Les canaux potassiques ( $\text{K}^+$ ) représentent le groupe de canaux le plus diversifié. Contrairement aux canaux  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , où quatre sous unités sont liées d'une manière covalente afin de former un canal fonctionnel, les canaux  $\text{K}^+$  s'assemblent d'une manière non covalente. Ce groupe de canaux  $\text{K}^+$  peut être divisé en trois groupes; dépendant de leurs différences structurelles et fonctionnelles : les canaux potassiques voltage dépendants ( $\text{K}_v$ ), les courants à rectification entrante ( $\text{K}_{ir}$ ) et les canaux à deux pores (FIGURE 6).



**Figure 6:** Vue de profil de la topologie des trois types de sous unités  $K^+$ . (A) Représentation schématique de la sous unité  $\alpha$  des canaux  $K^+$  voltage-dépendants composée de six segments transmembranaires (S1-S6) et du pore. Les protéines auxiliaires telles que minK et MiRP sont aussi démontrées schématiquement. (B) Sous unité  $\alpha$  des Kir formés par deux segments transmembranaires M1 et M2 connectés par un pore. La topologie du récepteur à la sulfonylurée qui interagit avec les sous unités  $\alpha$  de Kir6.x est aussi décrite démontrant ses différents domaines. (C) Représentation des sous unités  $\alpha$  des canaux de fond formés par quatre segments transmembranaires et deux pores.<sup>(198)</sup>

### 2-3-1 Clonage des canaux $K^+$

Le gène encodé par *Shaker* fut isolé de la Drosophile en 1987<sup>(292-294)</sup>. Utilisant des probes homologues au *Shaker* trois autres gènes  $K^+$  furent isolés<sup>(295;296)</sup> et nommés

*Shab*, *Shaw* et *Shal*. Chacun encodait des protéines partageant une haute homologie à la protéine *Shaker*. Les homologues mammifères des canaux *Shaker*, *Shab*, *Shaw* et *Shal* sont les sous familles Kv1, Kv2, Kv3 et Kv4, respectivement<sup>(246)</sup>. Ceux-ci représentent la sous unité  $\alpha$  du canal, mais d'autres sous familles ont été identifiées<sup>(297-301)</sup>, notamment, Kv5, Kv6, Kv7, Kv8 et Kv9, par contre ils sont des sous unités silencieuses qui ne produisent pas de canal fonctionnel.

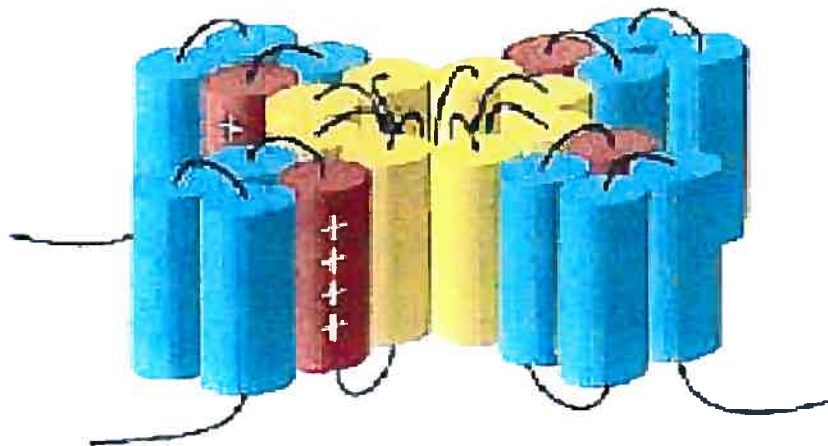
Courant	Gène	Canal	Modulateurs	Localisation
<i>Shaker</i>	KCNA1	Kv1.1	$\alpha$ -DTX, HgTX1	Neurones, coeur
	KCNA2	Kv1.2	CTX, $\alpha$ -DTX	Cerveau, coeur
	KCNA3	Kv1.3	AgTX2, $\alpha$ -DTX	Lymphocytes
	KCNA4	Kv1.4	UK78282	Cerveau, coeur
	KCNA5	Kv1.5	4AP, clofilium	Cerveau, coeur
	KCNA6	Kv1.6	$\alpha$ -DTX	Cerveau
	KCNA7	Kv1.7	4AP, capsaïcine	Cœur
<i>Shab</i>	KCNC1	Kv2.1	Hanatoxine, TEA	Cerveau, Coeur,
		Kv2.2		Reins, Rétine
<i>Shaw</i>	KCNC1	Kv3.1	4AP, TEA	Cerveau, muscle squelettique
	KCNC2	Kv3.2	4AP, TEA	Cerveau
	KCNC3	Kv3.3	4AP, TEA	Cerveau, foie
	KCNC4	Kv3.4	4AP, TEA	Cerveau, muscle squelettique
<i>Shal</i>	KCND1	Kv4.1	4AP	
	KCND2	Kv4.2	4AP, PaTX	Cerveau, Coeur
	KCND3	Kv4.3	4AP, PaTX	
Ether-a-go-go	KCNH1	ERG		Cerveau
	KCNH2	HERG	E4031, dofétilide	Cerveau, Coeur
	KCNH3	BEC1		Cerveau
	KCNH4	BEC2		Cerveau

**Tableau II** : Classification, localisation et pharmacologie des canaux potassiques Kv.

Le premier membre de la famille des canaux à rectification entrante fut cloné en 1993<sup>(203;302)</sup>. Depuis, plus de dix ADNc de sous unités de canaux Kir furent isolés et classifiés dans sept sous familles Kir1 à Kir7<sup>(303)</sup>.

### 2-3-2 Structure des canaux K<sup>+</sup>

Les canaux potassiques voltage dépendants partagent une topologie semblable à un domaine des canaux Ca<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup> (FIGURE 6). Des études utilisant des toxines spécifiques pour les canaux K<sup>+</sup> ont démontrées que ces canaux s'assemblaient en tétramères<sup>(304)</sup>, soit en homotétramères (FIGURE 7) ou en hétérotétramères.



**Figure 7:** Vue de l'assemblage des quatre sous unités de canaux K<sup>+</sup> voltage dépendants. Les segments S4 (senseur de voltage) en rouge, et les domaines (S5-P-S6) formant le pore et la voie de conduction d'ions en jaune. Adapté de Nerbonne, 2000<sup>(4)</sup>.

Une région de 114 acides aminés dans le N-terminus de *Shaker* a été reportée comme étant le site contenant les déterminants de la formation de tétramères. La

délétion de cette séquence abolit l'expression de courants  $K^+$ (<sup>305-307</sup>). Le pore H5 (pour Kir) et la région P (pour Kv) sont extrêmement bien conservés dans tous les canaux appartenant à la famille Kv et à la famille Kir. Il fut démontré par mutagenèse(<sup>305;308-310</sup>) que le pore consiste de deux vestibules larges séparés par une région relativement étroite(<sup>311</sup>).

Les canaux à rectification entrante n'ont que deux segments transmembranaires M1 et M2 liés ensemble par leur équivalent du pore la région H5. Par analogie au *Shaker* ces sous unités se rassemblent en tétramères, également. Ceux-ci pourraient également former des hétérotétramères, comme décrit plus haut.

### 2-3-3 Sous unités accessoires

Il existe plusieurs sous unités  $\beta$  qui se couplent au sous unités formant le pore ( $\alpha$ ) qui ont été clonées dans le tissu cardiaque(<sup>312-315</sup>). La principale fonction des sous unités  $\beta$  est de moduler les propriétés des sous unités  $\alpha$ . De plus il a été démontré qu'elles peuvent aussi moduler le transport à la membrane des sous unités  $\alpha$ (<sup>106</sup>).

Dans le cœur, trois sous unités  $\beta$  sont évidentes : minK (KCNE1), MiRP1 (KCNE2) et KChiP2. La dernière de cette série est une sous unité cytoplasmique, c'est-à-dire, qu'elle n'est pas associée à la membrane comme le sont ses deux homologues, minK et MiRP1 (FIGURE 6A).



## 2-3-4 Relations structure-fonction des canaux $K^+$ voltage dépendants

### 2-3-4-1 Inactivation

Quand un membre de la superfamille *Shaker* est exprimé dans un système d'expression hétérologue d'expression, deux profils de courants émergent. Un groupe de canaux (Kv1.4, Kv3.3, Kv3.4, Kv4.1, Kv4.2 et Kv4.3) s'activent et s'inactivent rapidement, tandis que d'autres (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 et Kv3.1) s'activent rapidement mais ont une inactivation lente ou inexistante.

#### 2-3-4-1-1 Inactivation de type N

L'inactivation de type N est connue sous le nom de « ball and chain » et implique la région N-terminale de la protéine<sup>(316;317)</sup>. Contrairement à l'inactivation du canal sodique, la particule responsable de l'inactivation rapide par occlusion de la voie de conduction des canaux  $K^+$  est située dans la région N-terminale de la protéine plus de 200 acides aminés en amont du premier segment transmembranaire S1<sup>(316)</sup>. Il est postulé que le bout de la région N-terminale se déplace pour s'installer dans la voie de conduction durant une dépolarisation ainsi occluant le canal à l'état ouvert mais non conduisant. La délétion de cette région abolit l'inactivation, ce mécanisme est restauré en ajoutant un peptide exogène dérivé de la séquence du N-terminal du canal. Quatre résidus formeraient la « balle » de ce complexe qui interagit, possiblement, avec le site liant les segments transmembranaires S4 et S5<sup>(318)</sup>.

### **2-3-4-1-2 Inactivation de type C**

Le deuxième type d'inactivation est nommé l'inactivation de type C<sup>(319)</sup>. Ce type d'inactivation persiste même après l'élimination de l'inactivation du type N. Des études montrent que des résidus extracellulaires du segment S6 seraient impliqués dans cette inactivation lente. L'inactivation de type C implique un mécanisme de changement de conformation impliquant la fermeture du pore<sup>(320)</sup>. La validité de ce mécanisme est appuyée, puisque lorsque le TEA est appliqué, l'inactivation de type C est significativement ralentie, suggérant une compétition entre le TEA et le site d'interaction de l'inactivation de type C<sup>(321)</sup>.

### **2-3-4-2 Senseur de voltage et l'activation**

Tout comme chez les canaux Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>, le segment transmembranaire S4 contient des résidus chargés à tous les trois résidus. Ce segment sert de senseur de voltage, puisque des mutations de certains résidus causent un changement dramatique dans la dépendance sur le voltage de l'activation<sup>(322;323)</sup>. Récemment, il a été démontré que le segment transmembranaire S4 pourrait, durant la dépolarisation, subir une glissement perpendiculaire à la membrane et exposer des résidus clés, causant le mouvement du segment S5 et de la porte d'activation<sup>(324)</sup>.

### 2-3-4-3 La structure du pore

Des expériences de mutagenèse ont démontré que le pore est composé non seulement de la région H5<sup>(325)</sup>, mais aussi en partie du segment S6 et de la séquence liant le segment S4-S5<sup>(326;327)</sup>. Certaines portions du pore sont les plus conservées parmi tous les canaux sélectifs au K<sup>+</sup>.

Une séquence caractéristique GXG est présente dans le pore de tous les canaux K<sup>+</sup> reportés, où X représente une tyrosine (Kv), une phénylalanine (eag) ou une leucine (TWIK-1)<sup>(328)</sup>. Cette séquence, qui peut être étendue à huit acides aminés TXXTXGYG et qui correspond à la séquence TMTTVGYG de la famille *Shaker*, est très conservée dans tous les canaux K<sup>+</sup> clonés à ce jour (TABLEAU III).

### 2-3-4-4 Sélectivité des ions

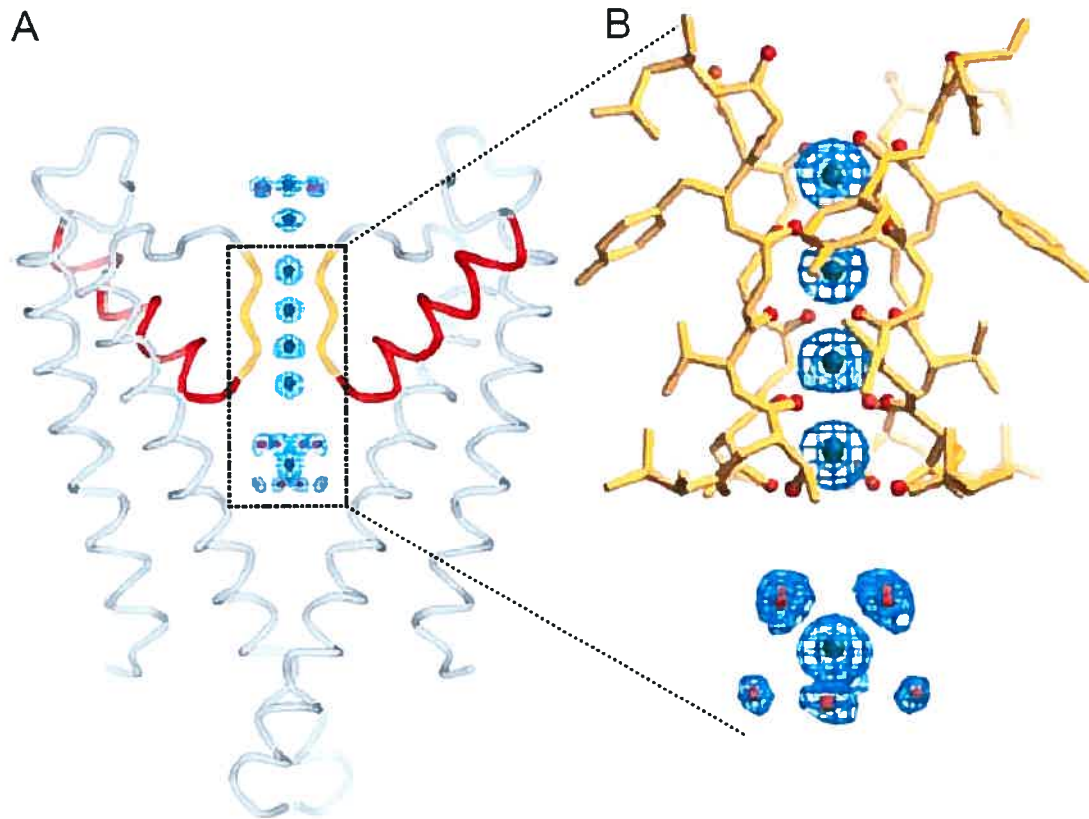
En 1998, la structure cristalline de la région du pore fut élucidée à partir de l'homologie entre les canaux potassiques mammifères et le canal bactérien *Streptomyces lividans* (KcsA)<sup>(329)</sup>. Ils ont trouvés que le filtre de sélectivité, la région responsable du passage d'ions K<sup>+</sup> et de l'exclusion d'ions Na<sup>+</sup>, est une structure ayant 12 Å de longueur et 34 Å de largeur, avec des parois construites d'atomes d'oxygène de la chaîne principale des résidus<sup>(329)</sup>.

Kv1	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv2	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv3	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv4	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv5	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv6	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv7	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv8	T	M	T	T	V	G	Y	G
Kv9	T	M	T	T	V	G	Y	G
HERG	S	L	T	S	V	G	F	G
KCNQ	T	L	T	T	I	G	Y	G
Kir1	T	Q	V	T	I	G	Y	G
Kir2	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Kir3	T	E	A	T	I	G	Y	G
Kir4	S	Q	T	T	I	G	Y	G
Kir5	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Kir6	V	Q	V	T	I	G	Y	G
Kir7	T	Q	L	T	I	G	Y	G
hTWIK-1 (pore 1)	V	L	S	T	T	G	Y	G
hTWIK-1 (pore 2)	S	L	S	T	I	G	L	G

**Tableau III** : Alignement de la séquence déduite de la région du pore de canaux  $K^+$ .

Ce pore constituant le centre de ce tétramère démontre une remarquable variabilité le long de la voie de conduction. Le côté cytoplasmique consiste d'un long tunnel rempli d'eau entouré majoritairement de résidus contenant des chaînes non polaires orientés vers l'axe du pore. Le diamètre de ce conduit est suffisamment large pour permettre le passage de cations complètement hydratés, et la nature hydrophobe de

cette région pourrait faciliter le flux de cations en minimisant leur interaction avec les résidus formants la paroi du conduit. Les cations échangent leurs eaux d'hydratation en se déplaçant le long de la voie de conduction.



**Figure 8:** La voie de conduction des canaux  $K^+$ . (A) Deux des quatre sous unités du pore KcsA. Chaque sous unité contient une hélice externe (S5) et une hélice interne (S6). La toile bleue démontre la densité d'électrons des ions  $K^+$  et de l'eau le long du pore. (B) Vue rapprochée du filtre de sélectivité (atomes d'oxygène carbonyle illustrés en rouge) ayant un ion  $K^+$  déshydraté à chacune des positions 1 à 4 et un ion hydraté dans la cavité centrale (intracellulaire au filtre de sélectivité). Adapté de MacKinnon, 2003<sup>(330)</sup>.

Le filtre de sélectivité est très étroit et ne permet de passer que deux ions  $K^+$  complètement déshydratés, à la fois (dans ses quatre sites, chaque atome d'oxygène n'hydrate qu'un ion  $K^+$  à la fois) (FIGURE 8)<sup>(330)</sup>. Il consiste de quatre ou cinq atomes

d'oxygène carbonyle de la chaîne principale des résidus de la paroi de chacune des quatre sous unités (illustrés en rouge dans la FIGURE 8). Ces atomes d'oxygène sont séparés par 3 à 4 Å pour former des anneaux qui remplaceront les eaux d'hydratation entourant l'ion  $K^+$ . Puisque cette énergie est maximalelement compensable par les atomes d'oxygène uniquement pour les ions de la taille des ions  $K^+$ , une plus haute énergie est nécessaire pour laisser passer les ions  $Na^+$ (<sup>329</sup>).

### **2-3-4-5 Rectification entrante des canaux Kir**

La rectification entrante des canaux Kir est le résultat du bloc, en configuration ouverte du canal, par le  $Mg^{2+}$ (<sup>331;332</sup>) ou les polyamines(<sup>333;334</sup>). Il fut reporté que des régions, en aval du segment M2, du C-terminal contiendraient les éléments structuraux nécessaires pour le bloc par le  $Mg^{2+}$  de haute affinité(<sup>335</sup>). Cette région contient plusieurs charges négatives et des régions d'hydrophobicité et pourraient contribuer à la liaison des polyamines et des ions  $Mg^{2+}$ . Un résidu glutamate du deuxième segment transmembranaire M2 de Kir2.1 et partiellement responsable du bloc par le  $Mg^{2+}$ (<sup>336</sup>). Une autre étude démontra que le glutamate en position 224 dans le C-terminal de Kir2.1 est un déterminant important de la haute sensibilité au  $Mg^{2+}$  et aux polyamines et que la neutralisation de charges négatives dans le M2 et le C-terminal réduit significativement la sensibilité de ce canal au  $Mg^{2+}$  et aux polyamines(<sup>337</sup>).

# **CHAPITRE TROISIÈME**

## **MÉCANISMES DE BASE DE L'ARYTHMIE CARDIAQUE**

### 3 Les mécanismes de l'arythmie cardiaque

Toute déstabilisation des courants ioniques peut mener à des instabilités dans le rythme cardiaque, causant ainsi l'arythmie. Les maladies qui rendent le myocarde susceptible à l'arythmie incluent : la maladie de l'artère coronarienne, la péricardite, la maladie congénitale du cœur, la maladie de la valve mitrale, l'hypertension, l'ischémie, et la défaillance cardiaque. Il existe quatre mécanismes reconnus de l'arythmie cardiaque. Les post-dépolarisations précoces, les post-dépolarisations tardives, l'automaticité anormale et la réentrée.

#### 3-1 Les post-dépolarisations précoces (EADs)

L'activité se déroulant avant la repolarisation complète du potentiel d'action est considérée un EAD (pour *early after depolarization*). Généralement, ils prennent place quand le potentiel d'action est prolongé, reflétant un déséquilibre dans les courants formant le plateau, favorisant la dépolarisation (diminution du courant  $K^+$  sortant ou augmentation des courants entrants  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$ ). Les EADs sont plus souvent observés dans les fibres de Purkinje<sup>(338)</sup> et les cellules M du ventricule<sup>(339)</sup> que dans l'oreillette ou le tissu ventriculaire. Les EADs se prononcent durant la phase 2 et 3 du potentiel d'action. Les EADs de la phase 2 sont plus importants que ceux générés durant la phase 3 puisque plusieurs études suggèrent que ceux de la phase 3 sont plus rares et plus difficiles à générer. Le déséquilibre du plateau favorisant la dépolarisation est du à la diminution des courants sortants, notamment;  $I_K$ ,  $I_{to}$ , et  $I_{K1}$ <sup>(131;340-343)</sup>. La prolongation de la durée du potentiel d'action dans le cadre de cette diminution importante des courants



sortants permet aux courants  $I_{CaL}$  (EAD phase 2)<sup>(338;344-346)</sup>,  $I_{Na}$  rapide réactivé et NCX (EAD phase 3)<sup>(346)</sup> de déclencher une post-dépolarisation précoce. Si ces dépolarisations atteignent le potentiel de seuil, une autre dépolarisation pourrait être générée ou la réentrée d'une vague stimulatrice pourrait être induite et ceci pourrait continuer indéfiniment<sup>(347)</sup>. Les EADs sont impliqués dans les arythmies des patients ayant un segment QT prolongé (LQTS), dans lequel ce phénotype reflète une repolarisation défectueuse. Les patients ayant le syndrome du long QT congénital expriment plusieurs mutations dans les gènes encodant les différentes sous unités des canaux  $K^+$  : notamment; *KvLQT1* (LQT1), *HERG* (LQT2), *KCNE1* (LQT5) et *KCNE2* (LQT6). De plus, des mutations affectant l'inactivation de la sous unité du canal  $Na^+$ ,  $Na_v1.5$  (LQT3) et des mutations affectant la protéine d'ancrage ankyrin-B (LQT4) ont aussi été impliquées dans la syndrome du long QT<sup>(348)</sup>.

Des agents pharmacologiques ont aussi été impliqués dans le syndrome du long QT acquis<sup>(349)</sup>. Les agents antiarythmiques de classe III (prolongeurs du potentiel d'action) bloquent les courants repolarisants qui prédisposent ces patients à des torsades de pointes (une arythmie ventriculaire polymorphe)<sup>(350;351)</sup> en mimant les défauts fonctionnels du LQTS congénital.

### 3-2 Les post-dépolarisations tardives (DADs)

Les post-dépolarisations tardives peuvent survenir tôt après la fin de la phase 3 du potentiel d'action. Les DADs (*delayed afterdepolarizations*) sont présents dans le ventricule, les fibres de Purkinje et l'oreillette et sont causés par la surcharge de  $Ca^{2+}$  cellulaire qui cause la relâche secondaire du réticulum sarcoplasmique (SR) suite à la repolarisation du potentiel d'action<sup>(352-354)</sup>. La relâche spontanée de  $Ca^{2+}$  prime l'activité

de l'échangeur NCX, qui échange un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sortant pour trois ions  $\text{Na}^+$  entrant causant un flux net entrant positif.

$I_{\text{CaL}}$  est la conductance la plus importante déterminant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  cellulaire et puisque la surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  est la plus importante contribution à la formation des DADs,  $I_{\text{CaL}}$  y joue un rôle primordial. Le système nerveux sympathique est souvent activé dans la maladie du myocarde et mène à une augmentation du courant  $I_{\text{CaL}}$ , cette augmentation mène en suite, à la surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  (<sup>355-358</sup>). Les DADs sont important dans la pathophysiologie des tachyarythmies associées à la toxicité de la digitalis (<sup>359;360</sup>). Les glycosides cardiaques peuvent également causer des DADs en inhibant la pompe NaK, menant à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (<sup>361;362</sup>).

### 3-3 L'automatisme anormal

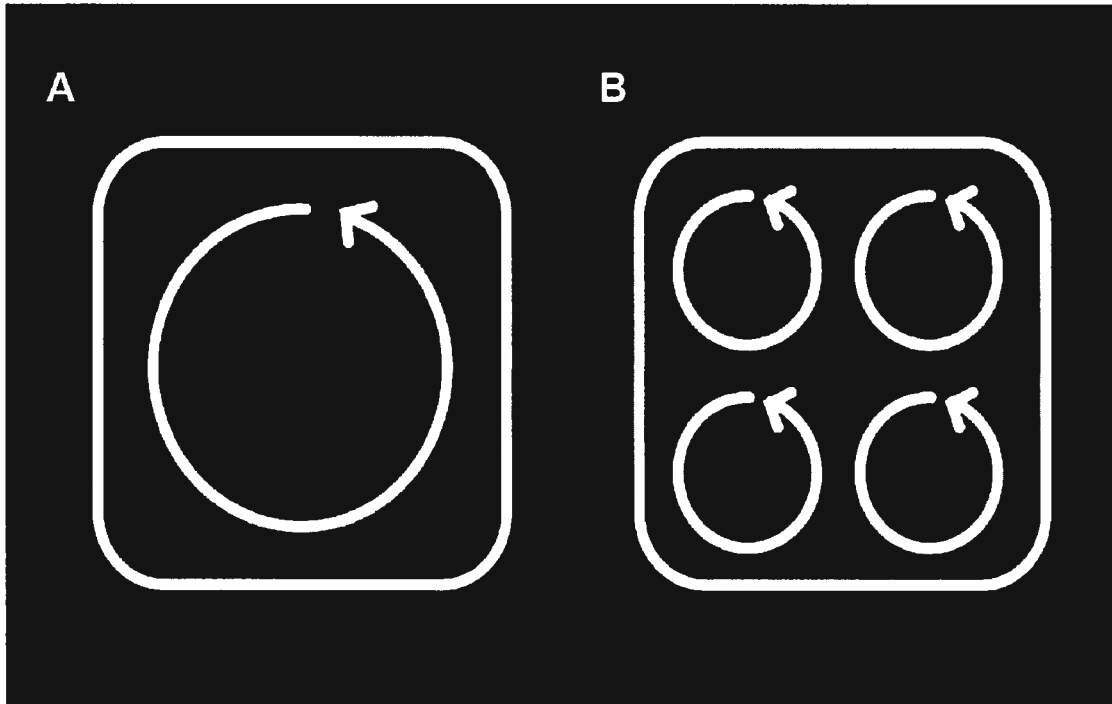
Le taux de formation d'impulsions spontanés est généralement plus rapide dans la région pacemaker du nœud sinusal. L'automatisme excessivement rapide ou anormal dans d'autres régions du cœur peut mener à des tachycardies ectopiques. Les fibres de Purkinje sont particulièrement prône à l'automatisme anormal sous l'influence de la surstimulation sympathique (<sup>363</sup>) ou autre pathologie cardiaque (<sup>364</sup>). L'automatisme peut aussi être observée dans l'oreillette et le ventricule de cœurs atteints d'une maladie. Tandis que ces régions n'expriment pas généralement d'automatisme, le potentiel membranaire de repos devient dépolarisé durant la maladie (<sup>365-369</sup>), probablement un résultat de la diminution de l'expression de  $I_{\text{K1}}$  (<sup>131</sup>). Le potentiel de repos membranaire plus positif facilite l'initiation d'un potentiel d'action par des dépolarisations diastoliques (<sup>370;371</sup>).

### 3-4 La réentrée

La réentrée est un désordre de la propagation de l'impulsion et la cause de plusieurs tachyarythmies cliniques<sup>(372)</sup>. Il y a trois conditions pour la formation de tachycardies réentrantes : (i) deux voies de propagation du potentiel d'action doivent être jointes, (ii) ces deux voies doivent avoir des périodes réfractaires différentes et (iii) un équilibre approprié doit exister entre la période réfractaire et la conduction pour que la réentrée, une fois initiée, soit soutenue. L'initiation de la réentrée se fait quand un battement précoce (initié par un des autres mécanismes d'arythmie) excite une voie mais arrive durant la période réfractaire d'une autre.

#### 3-4-1 La fibrillation

Les formes plus complexes de réentrée, comme la fibrillation, incorporent de multiples vagues de réentrée simultanées qui ne sont pas fixes dans le temps ou l'espace. En général, le nombre de vagues de réexcitation pouvant être accommodé est déterminé par la longueur d'onde de cette vague (donnée par le produit de la période réfractaire et la vitesse de conduction)<sup>(373)</sup>.



**Figure 9:** Schéma illustrant la taille de l'oreillette comparée au nombre de circuits réentrant dépendant de leur longueur d'onde.

La fibrillation auriculaire est basée sur la réentrée de multiples circuits, et donc, l'état réfractaire du tissu est un facteur important contrôlant l'établissement de l'arythmie. Le prolongement de la période réfractaire causerait l'augmentation de la durée de la longueur d'onde, et donc; limitant le nombre de circuits fonctionnels pouvant être accommodés dans l'oreillette, réduisant ainsi la chance du maintien de la fibrillation auriculaire. La limitation majeure à cette approche est que la prolongation de la période réfractaire a tendance à promouvoir des EADs. Pour cibler les périodes réfractaires de tissus en arythmie sans promouvoir d'arythmie dans d'autres tissus, il est nécessaire d'atteindre les tissus battant à de hauts rythmes ou cibler sélectivement le tissu atteint (ex : l'oreillette).

### 3-5 Le problème de la proarythmie

La proarythmie résulte quand un agent antiarythmique développé pour cibler une arythmie, paradoxalement, aggrave ou initialise une autre. Pour les bloqueurs des canaux  $\text{Na}^+$ , par exemple, ils suppriment effectivement les complexes ectopiques dus à l'automaticité anormale ou l'arythmie déclenchée, par contre ils peuvent augmenter le risque d'arythmies réentrantes potentiellement fatales en réduisant la vitesse de conduction. Les bloqueurs de canaux  $\text{K}^+$  suppriment la réentrée en prolongeant la période réfractaire d'un tissu, par contre, en faisant cela ils augmentent le risque de développer des EADs qui peuvent menacer la vie de l'individu. Le plus grand obstacle dans le développement de nouveaux antiarythmiques est d'obtenir une suppression sélective du mécanisme d'arythmie impliqué sans déclencher d'autres formes d'arythmogénèse.

**DEUXIÈME PARTIE:**  
**CONTRIBUTION ORIGINALE**

# **HYPOTHÈSES ET BUTS DU PROJET DE RECHERCHE**

L'étude des propriétés pharmacologiques des différents canaux cardiaques est très importante afin de pouvoir éventuellement développer des agents antiarythmiques plus sélectifs ayant moins d'effets secondaires nuisibles.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés aux propriétés pharmacologiques des canaux potassiques voltage dépendants. Nous avons comparé l'effet de la flécaïnide sur Kv1.5, Kv3.1, Kv1.4 et Kv4.2. Nous avons pu déterminer que les sous unités une fois exprimées dans un système hétérologue d'expression ont des propriétés de sensibilité à la flécaïnide semblable à celles de leurs courants endogènes observés dans des myocytes cardiaques.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence les sites critiques pour conférer la sensibilité des canaux potassiques voltage dépendants à la flécaïnide.

Un résidu leucine dans le segment transmembranaire S6 de ces canaux gouverne cette sensibilité à la flécaïnide. Ce phénomène fut mis en évidence en mutant le résidu isoleucine des canaux insensibles à une leucine et observant une sensibilité à la flécaïnide semblable à celle des canaux sensibles de type sauvage.

Ce mémoire illustre, pour la première fois, la base moléculaire de l'effet de la flécaïnide et sert de base pour le développement d'autres molécules plus spécifiques ayant moins d'effets secondaires.



# CHAPITRE PREMIER

## A SINGLE RESIDUE IN THE S6 TRANSMEMBRANE DOMAIN GOVERNS THE DIFFERENTIAL FLECAINIDE SENSITIVITY OF VOLTAGE GATED POTASSIUM CHANNELS

Ce manuscrit a été resoumis à la revue *Molecular Pharmacology* suite à une demande de révision par le comité éditorial.

# **A Single Residue in the S6 Transmembrane Domain Governs the Differential Flecainide Sensitivity of Voltage-gated Potassium Channels**

DANIEL HERRERA, AIDA MAMARBACHI, MANUEL SIMOES,  
LUCIE PARENT, RÉMY SAUVÉ, ZHIGUO WANG, and STANLEY  
NATTEL

*From the Research Center and Department of Medicine (D.H., A.M., Z.W., S.N.),  
Montreal Heart Institute and University of Montreal; Departments of Pharmacology  
(D.H.) and Physiology (M.S., L.P., R.S.), University of Montreal; Department of  
Pharmacology and Therapeutics, (S.N.), McGill University, Montreal, Quebec, Canada.*

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Quebec  
Heart and Stroke Foundation and the Mathematics of Information Technology and  
Complex Systems (MITACS) Network.

**Running title:** S6 Domain Residue and Kv Blocker Sensitivity

**Correspondence to:** Dr Stanley Nattel, Research Center, Montreal Heart Institute,  
5000 Belanger St E, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: (514)-376-3330;  
Fax: (514)-376-1355; [REDACTED]

**Number of text pages:** 17

**Number of tables:** 3

**Number of figures:** 8

**Number of references:** 47

**Number of words in the Abstract:** 225

**Number of words in the Introduction:** 362

**Number of words in the Discussion:** 1839

**Abbreviations:**

HERG = human ether-a-go-go-related gene

$I_{Kur}$  = ultrarapid-delayed rectifier currents

KcsA = streptomyces lividans potassium channel

Kv = voltage-gated  $K^+$

MthK = methanobacterium thermoautotrophicum potassium channel

PCRs = polymerase chain reactions

$V_{1/2}$  = half-maximal activation voltage

WT = wild-type

## 1 ABSTRACT

Flecainide has been used to differentiate Kv4.2-based transient-outward K<sup>+</sup>-currents (flecainide-sensitive) from Kv1.4-based (flecainide-insensitive). We found that flecainide also inhibits ultrarapid-delayed rectifier (I<sub>Kur</sub>) currents in *Xenopus* oocytes carried by Kv3.1 subunits (IC<sub>50</sub>, 28.3±1.3 μM) more strongly than Kv1.5 currents corresponding to human I<sub>Kur</sub> (237.1±6.2 μM). The present study examined molecular motifs underlying differential flecainide sensitivity. An initial chimeric approach pointed to a role for S6 and/or carboxy-terminal sites in Kv3.1/Kv1.5 sensitivity-differences. We then looked for homologous amino-acid residues of the two sensitive subunits (Kv4.2 and Kv3.1) different from homologous residues for insensitive subunits (Kv1.4 and Kv1.5). Three candidate sites were identified: two in the S5-S6 linker and one in the S6 segment. Mutation of the proximal S5-S6 linker site failed to alter flecainide-sensitivity. Mutation at the more distal site in Kv1.5 (V481L) modestly increased sensitivity, but the reciprocal Kv3.1 mutation (L401V) had no effect. S6 mutants caused marked changes: flecainide sensitivity decreased ~8-fold for Kv3.1 L422I (to IC<sub>50</sub> 213±9 μM) and increased ~7-fold for Kv1.5 I502L (to 35.6±1.9 μM). Corresponding mutations reversed flecainide-sensitivity of Kv1.4 and Kv4.2: L392I decreased Kv4.2-sensitivity ~17-fold (from IC<sub>50</sub> 37.4±6.9 to 628±36 μM); I547L increased Kv1.4-sensitivity ~15-fold (from 706±37 to 40.9±7.3 μM). Our observations indicate that the flecainide sensitivity differences among these four voltage-gated K<sup>+</sup>-channels are determined by whether an isoleucine or a leucine is present at a specific amino acid location.

## 2 Introduction

Voltage-gated  $K^+$ -channels of the Shaker family play an important role in governing cardiac excitability (Roden and George 1997; Snyders, 1999). A variety of antiarrhythmic agents target Shaker-based channels (Tamargo et al., 2004; Varro et al., 2004), and such actions are believed to contribute to their actions in man. The cardiac transient outward current ( $I_{to}$ ) subunits Kv1.4 and Kv4.2 differ in their sensitivity to the antiarrhythmic drug flecainide, with Kv4.2 being much more sensitive than Kv1.4. This difference has been used to probe the various contributions of Kv1.4 and Kv4.2 to native  $I_{to}$  in the rat (Yeola and Snyders, 1997). Kv1.5, the principal ionic current underlying human atrial ultra-rapid delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ) (Wang et al., 1993; Feng et al., 1997) is a potentially interesting atrial-selective ionic target for drug therapy of atrial fibrillation (AF) (Nattel et al., 1999). The dog counterpart,  $I_{Kur,d}$ , appears to have a contribution from Kv3.1 subunits (Yue et al., 1996; Yue et al., 2000a), although the importance of this contribution has recently been questioned (Fedida et al., 2003). In previous work, we found  $I_{Kur,d}$  to be sensitive to flecainide (Yue et al., 2000b), unlike human  $I_{Kur}$ , which appears resistant (Wang et al., 1995). In preliminary studies, we observed corresponding differences in the flecainide sensitivity of Kv3.1 and Kv1.5 (Herrera et al., 2002), reminiscent of the differences typically observed between Kv4.2 and Kv1.4. The present study was designed to characterize flecainide block of Kv3.1 and Kv1.5, and then to determine whether there is a common molecular basis for flecainide-sensitivity differences between Kv1.4 and Kv1.5 on one hand, and Kv3.1 and Kv4.2 on the other.

We began by constructing several chimeras of the Kv3.1 and Kv1.5 wild-type channels to identify important domains of flecainide block in these channels. This was

followed by site-directed mutagenesis of the identified domains to determine whether specific residues might modulate sensitivity of these channels to flecainide. The results of these studies pointed to a key role for the presence of leucine versus isoleucine at a specific amino acid location. Finally, a mathematical model was applied to assess the location and orientation of this amino acid in relation to key structures in the Kv3.1 channel molecule.

### 3 Materials and Methods

**3-1 Molecular Biology.** Wild-type (WT) dKv3.1 (GenBank #AF153198), hKv1.5 (GenBank #XM\_006988, kindly provided by Dr. Barbara Wible) and rKv1.4 (GenBank #NM\_012971, kindly provided by Dr. Barbara Wible), were cloned into a pSP64 (Promega, Madison, WI) and rKv4.2 (GenBank #S64320, kindly provided by Dr. Jeanne Nerbonne) into a pRC-CMV expression vector (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) with identical restriction endonuclease sites flanking the clone in the polyclonal region for ligating the digest product into the target vector.

For chimera construction we performed a series of polymerase chain reactions (PCRs) with Elongase Enzyme Mix (Invitrogen Life Technologies) and respective WTs as templates. For overlap extension of both products we used a third PCR and the products of each of the previous reactions as the template. The synthetic oligonucleotide primers used for the first reactions contained the ends of the chimera and the restriction endonuclease sites for cloning into the expression vector (Table 1). The complementary primer contained part of one clone and an overlap overhang for the overlap extension PCR. The third PCR employed the end primers to create a continuous string of nucleotides of the desired sequence. The final products and target vectors were digested with appropriate restriction endonucleases (Table 1) and ligated with Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs, Beverly, MA).

For site-directed mutagenesis, PCR was applied, with a synthetic oligonucleotide primer containing the desired nucleotide to create the point mutation upon translation. Two complementary primers containing desired mutation and PCR primers flanking unique restriction enzyme sites enclosed the region of interest. Two parallel PCR reactions, each with a flanking primer and a primer containing the desired mutation,

generated two DNA fragments with overlapping ends. After gel purification, both fragments were annealed in a third PCR using the two restriction site flanking primers, resulting in a fragment containing the desired mutation. The final PCR product was digested with the flanking restriction enzymes, gel-purified, and TOPO-TA cloned into the PCRII vector. All PCR-generated sequences were verified by double-stranded sequencing. After sequence confirmation, the mutant was released from PCRII at flanking restriction sites and ligated into pSP64 (or pRC-CMV) containing the coding region for the respective WT from which the segments enclosed by the restriction enzyme sites had been removed.

**3-2 Oocyte Isolation.** Frogs were anesthetized by immersion in tricaine methanesulfonate for approximately 25 minutes. Oocytes were excised and immersed in a 100-mm Petri dish containing Barth's solution (mM): 100 NaCl, 2.0 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, and 5.0 HEPES, pH 7.4 (NaOH) at room temperature. Oocytes were physically separated, then immersed (~60 minutes) in 7 ml of calcium-free Barth's-collagenase solution containing (mM): 82.5 NaCl, 2.0 KCl, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, and 5.0 HEPES, 0.0247 g lyophilized collagenase type A (Invitrogen) and 0.0075 g trypsin inhibitor. Oocytes were incubated in Barth's solution containing penicillin (1000 U/L) (Invitrogen), streptomycin (100 mg/L) (Invitrogen), kanamycin (100 mg/L) and sodium pyruvate (275 mg/L) (Sigma) for 12 hours at 15°C.

5'-Capped polyadenylated cRNA was prepared for each construct with the SP6 mMessage mMachine in-vitro transcription kit (Ambion) after cDNA linearization. *Xenopus* oocytes were injected with ~1-1.4 ng/oocyte of cRNA using a microinjector and stored for at least 12 hours in Barth's solution containing antibiotics and 5% horse serum



at 15°C. Oocytes were placed in a recording/perfusion chamber and perfused at 0.5 mL/min with (mM): 5.0 KCl, 100 NaCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 0.3 CaCl<sub>2</sub>, 10 *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4 (NaOH).

**3-3 Data Acquisition and Analysis.** Whole-cell currents were recorded at room temperature with 2-electrode voltage-clamp. Borosilicate-glass electrodes (outer diameter 1.0 mm) filled with 3 M KCl (resistances 1-2 MΩ) were connected to a GeneClamp-500B amplifier (Axon). Current-injecting electrode resistance averaged 1.5 MΩ. Voltage command pulses were generated with pClamp 6 software connected to a 12-bit Digidata 1200 analog-to-digital converter (Axon). A holding potential (HP) of -60 mV was used as in previous studies of native currents (Yue et al., 2000; Wang et al., 1995). The effects of flecainide (Sigma) exposure were monitored with test pulses to +60 mV (in 10 mV steps). The inter-pulse interval was 10 seconds for all protocols and pulse length is indicated in figure insets. Recordings were low-pass filtered at 1 kHz. Data were analyzed with pClamp 6 (Axon Instruments) and are expressed as mean±S.E.M. Group comparisons were performed with ANOVA. If significant differences were indicated by ANOVA, a *t*-test with Bonferroni's correction was used to evaluate differences between individual mean values. A two-tailed  $P < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

**3-4 Homology Modeling of the Kv3.1 Pore.** Two models of the Kv3.1 channel were generated using the KcsA (*Streptomyces lividans*) potassium channel (PDB: 1J95) and the MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) potassium channel (PDB: 1LNQ) channel structures as templates. The sequence alignment between the Kv3.1 pore-S6

region, MthK and KcsA was performed with SAM-T02 (Hughey and Krogh, 1996). Automated homology modeling was carried out with Modeller V6.2 (Sali and Blundell, 1993) and involved the generation of 150 models of the Kv3.1 channel pore for each structural template. Model selection was based on the lowest objective function value (roughly related to the energy of the model) provided by Modeller (Sali and Blundell, 1993) and on the RMS deviation between the atomic coordinates of the template relative to the model. Energy minimization was carried out on the four best models using Charmm (Brooks et al., 1983). The overall structural quality of the generated models was confirmed by PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Structural features of flecainide were approximated using HyperChem 7.5 (Hyperchem, Gainesville, FL) and the AMBER force field (Weiner et al., 1984).

## 4 Results

**4-1 Effects of Flecaïnide on Kv3.1 and Kv1.5.** The effects of flecaïnide on Kv3.1 WT and Kv1.5 WT were characterized by eliciting currents in response to pulses to potentials ranging from -50 to +60 mV in increments of 10 mV from a holding potential of -60 mV. Test pulses elicited rapidly activating outward currents with very slow inactivation in the absence of flecaïnide (Fig. 1). Reduced current increments were seen for Kv3.1 at potentials positive to +30 mV, compatible with inward rectification, as previously described for dKv3.1 (Yue et al., 1996; Yue et al., 2000a). Flecaïnide (50  $\mu$ M) caused rapid decay of Kv3.1 currents upon depolarization, compatible with open-channel block, and potently decreased end-pulse current amplitude (Fig. 1A). Overall, 50  $\mu$ M flecaïnide significantly inhibited dKv3.1 current at all voltages positive to 0 mV, with a mean  $58.9 \pm 3.9\%$  reduction at +30 mV (Fig. 1B). In contrast, the same concentration of flecaïnide had little apparent effect on Kv1.5 currents (Fig. 1C), and mean Kv1.5 current amplitude was not significantly affected (Fig. 1D). These observations indicate important differences between Kv1.5 and Kv3.1 in their sensitivity to the drug.

Figure 2 shows the effects of the full range of drug concentrations on Kv3.1 and Kv1.5. Figure 2A illustrates the effects of increasing drug concentrations on current recorded upon stepping from -60 to +30 mV in single oocytes expressing each subunit. Flecaïnide appreciably decreased Kv3.1 current at 20  $\mu$ M and produced near-total block of end-pulse current at 500  $\mu$ M. In contrast, Kv1.5 was minimally affected by 50  $\mu$ M flecaïnide and 500  $\mu$ M drug produced just over 50% inhibition. Figure 2B shows mean concentration-response data for flecaïnide inhibition of Kv3.1 and Kv1.5 at +30 mV. The flecaïnide  $IC_{50}$ s for Kv3.1 end-pulse current at +30 mV averaged  $28.3 \pm 1.3 \mu$ M with a Hill

coefficient ( $n_H$ ) of  $0.91 \pm 0.1$  in 11 oocytes, an order of magnitude less than the corresponding value for Kv1.5 ( $237.1 \pm 6.2 \mu\text{M}$ , Hill coefficient  $1.1 \pm 0.2$   $n=8$  oocytes,  $P < 0.001$ ). Figure 2C shows the percentage inhibition by two concentrations of flecainide on Kv3.1 and Kv1.5 at different test potentials. Inhibition showed shallow voltage-dependence for both subunits. At approximately equipotent flecainide concentrations ( $50 \mu\text{M}$  for Kv3.1,  $500 \mu\text{M}$  for Kv1.5), block as a function of voltage is not significantly different for the two subunits. Figures 2D and 2E show the activation curve for Kv3.1 and Kv1.5, respectively, based on an analysis of tail currents following 400-ms test pulses to various activation voltages, before and after exposure to approximately equipotent drug concentrations. The half-maximal activation voltage ( $V_{1/2}$ ) of Kv3.1 was  $-1.7 \pm 0.4$  mV (slope factor  $8.2 \pm 1.3$  mV), and this was slightly shifted to  $-6.8 \pm 1.5$  mV, ( $P < 0.05$ ; slope factor  $7.4 \pm 1.9$  mV) after exposure to flecainide. For Kv1.5, the  $V_{1/2}$  was  $-11.6 \pm 1.8$  mV (slope factor  $7.2 \pm 1.8$  mV) before and  $-16.9 \pm 1.9$  mV (slope factor  $7.4 \pm 1.9$  mV) after  $500 \mu\text{M}$  flecainide.

The rapid decay of current in the presence of flecainide suggests open-channel blocking. Figure 3A (inset) shows the onset of Kv3.1 block as a function of time during the pulse at three concentrations of flecainide. Block was a discrete function of time, well-fit by exponential relations as shown, and accelerated at higher drug concentrations. The regression lines in Fig 3A are an analysis of blocking kinetics as a function of drug concentration. The blocking rate constant ( $K$ ) was a linear function of concentration ( $C$ ), consistent with a standard blocking model,  $K = k_{\text{off}} + k_{\text{on}}[C]$  (where  $k_{\text{off}}$  and  $k_{\text{on}}$  are rate constants for drug-receptor association and dissociation).  $K$  is obtained from best-fit regression of the onset of block at each concentration to a single exponential function  $B(t) = B_0 + B_{\text{id}}(1 - \exp[-Kt])$ , where  $B(t)$  is block at time  $t$ ,  $B_0$  = block upon pulse onset and

$B_{\text{id}}$ =steady-state time-dependent block. The dissociation constant ( $K_d$ ) is given by  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  and the exponential block-onset time constant  $\tau_B$  at any concentration  $[C]$  is given by  $1/(k_{\text{on}}[C] + k_{\text{off}})$ , with the net rate constant  $K$  being  $1/\tau_B$ . When this relation was analyzed in each of 8 experiments with Kv3.1, we obtained a mean  $k_{\text{on}}$  of  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $k_{\text{off}}$  of  $39.8 \pm 5.3 \text{ s}^{-1}$ . The  $K_d$  estimated from  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  of the kinetic analysis averaged  $28.8 \pm 3.6 \mu\text{M}$ , in good agreement with the directly measured  $\text{IC}_{50}$  ( $28.3 \mu\text{M}$ ) as obtained in Fig. 2A. Figure 3B shows corresponding data for Kv1.5. The results are qualitatively similar, with lower blocking rates for a given concentration. For Kv1.5,  $k_{\text{on}}$  averaged  $0.30 \pm 0.02 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $k_{\text{off}}$   $60.0 \pm 5.5 \text{ s}^{-1}$  ( $n=8$  oocytes).  $K_d$  estimated from the kinetic analysis averaged  $210.8 \pm 5.9 \mu\text{M}$ , once again in reasonable agreement with the directly measured  $\text{IC}_{50}$  ( $237 \mu\text{M}$ ). Table 2 shows the calculated rate constants. The time-dependent block onset in Fig. 3A and B are compatible with open-channel block. This notion is further supported by observations of crossover of control tail currents with those in the presence of blocking drug concentrations for Kv3.1 (Fig. 3C) and Kv1.5 (Fig. 3D). Upon repolarisation in the absence of drug, rapid time-dependent transition of channels from the open to the closed state provides characteristic deactivating tail currents. In the presence of drug, deactivation of unblocked channels is similarly rapid. However, for many open-channel blockers, unblocking must occur in the open state, there is low affinity for the closed state and drug-bound channels must unblock before closing. If a large fraction of channels have been blocked during depolarization and the unbinding rate  $k_{\text{off}}$  is fast enough, channels may unblock through the open state upon repolarization and carry significant current, thus slowing the apparent rate of deactivation. This process will be reflected in a slower time course of the tail current, resulting in tail current 'crossover' (Armstrong, 1971). The tail-current time course was fitted by monoexponential relations (as shown by

the solid lines fitted to the experimental data points shown in Figures 3C and D), providing the mean data shown in Figure 3E. These results show that the rate of current decay upon repolarisation was prolonged significantly in the presence of drug. Kv3.1 tail-current time constants increased from  $54.8 \pm 2.7$  ms (control) to  $218.2 \pm 9.6$  ms in presence of flecainide  $50 \mu\text{M}$  ( $P=0.0017$ ,  $n=8$  oocytes). Corresponding values for Kv1.5 before and after  $100 \mu\text{M}$  flecainide were  $115.6 \pm 3.0$  ms and  $247.4 \pm 7.2$  ms, respectively ( $P=0.0173$ ,  $n=8$  oocytes).

**4-2 Response of Kv3.1/Kv1.5 Chimeras to Flecainide.** As an initial approach to analyzing the molecular determinants of the differential flecainide sensitivity of Kv3.1 and Kv1.5, we constructed chimeras between the two subunits. Two sets of reciprocal chimeras were constructed. Since we had already observed block of the wild-type channels in their open configuration we decided to concentrate on the pore to C-terminal region (see figure 3C, D and E). One set of chimeras involved the C-terminal distal to position Asn-436 in Kv3.1 and Asn-518 in Kv1.5. Figure 4A, top panels, show typical recordings before and after  $50 \mu\text{M}$  flecainide in WT Kv3.1 and Kv1.5, whereas the middle panels show corresponding recordings from Kv3.1 subunits with their C-terminal replaced by those of Kv1.5 and Kv1.5 subunits with Kv3.1 C-terminal substitution. There was clearly no major change in sensitivity. We therefore interchanged longer segments of each subunit, involving the C-terminal distal to Met-414 in the Kv3.1 S6 segment and Lys-494 in the Kv1.5 S6. Figure 4A (bottom panels) show that flecainide sensitivity was somewhat decreased for Kv3.1 subunits containing the S6+C-terminal component of Kv1.5 and that sensitivity was increased for the corresponding Kv1.5 chimera. Figure 4B compares mean $\pm$ S.E.M. concentration-response data for the S6+C-

terminal chimeras with those of WT at +30 mV. Results for the chimeras clearly lie in a position different from those of the WT and close to each other. Mean  $IC_{50}$ s at +30 mV based on values calculated for each oocyte studied for WT and both sets of chimeric constructs are shown in Fig. 4C. Whereas values for the C-terminal chimeras are indistinguishable from WT, values for the S6+C-terminal chimeras are significantly different from their respective WT and not different from each other. These results suggest that molecular motifs in S6 play a role in determining the flecainide affinity differences between Kv3.1 and Kv1.5. We next proceeded to address the potential role of specific amino acid residues in these drug affinity differences.

#### **4-3 Effects of Mutating Candidate Amino Acids in Kv3.1 and Kv1.5 on Flecainide**

**Sensitivity.** The results described above suggest that flecainide produces open-channel block of both Kv3.1 and Kv1.5, with marked differences in affinity. We noted that similar differences in flecainide affinity had previously been reported for Kv1.4 (Yamagishi et al., 1995), which like its Kv1 subfamily co-member Kv1.5 is flecainide-insensitive, and Kv4.2 (Caballero et al., 2003), which is typically flecainide-sensitive. In addition, we noted that many of the amino acids that determine drug block of voltage-dependent  $K^+$ -channels are situated in the S5-S6 linker region or in S6 (Yeola et al., 1996; Franqueza et al., 1997; Zhang et al., 1998; Caballero et al., 2002; Decher et al., 2004). We therefore aligned and compared these portions of the sequences of rKv1.4, hKv1.5, dKv3.1 and rKv4.2 with one another. As shown in Fig. 5, there was a large degree of homology among these subunits. At three positions (shown by boxes and symbols corresponding to their respective position in the channel protein), amino-acid residues corresponded for Kv1.4 and Kv1.5, on one hand, and for Kv3.1 and Kv4.2, on the other, but differed between the sensitive and insensitive subunits.

We therefore considered these three amino acid residues to be candidates to play a role in the difference in flecainide sensitivity between the sensitive subunits Kv3.1 and Kv4.2 and the insensitive subunits Kv1.4 and Kv1.5. We first used site-directed mutagenesis to alter each of these amino acids in Kv3.1 to those in Kv1.5, and to alter the amino acids in Kv1.5 to those in Kv3.1. Figure 6A illustrates the effects of several flecainide concentrations on current at +30 mV in oocytes expressing WT subunits and each of the point mutations. The response of Kv3.1 subunits with the I389D mutation was similar to that of the WT subunits shown immediately above. Similarly, Kv1.5 with the reciprocal D469I mutation responded like Kv1.5 WT. The response of L401V Kv3.1 also resembled that of Kv3.1 WT, but the reciprocal V481L Kv1.5 appeared somewhat more sensitive to flecainide than Kv1.5 WT. The mutations shown in the bottom panels of Fig. 6A had quite striking effects. The L422I mutation strongly decreased the sensitivity of Kv3.1, whereas I502L strongly increased that of Kv1.5.

Figure 6B shows the mean  $IC_{50}$ s for each of the constructs studied at +30 mV. The isoleucine/aspartic acid mutations did not alter the  $IC_{50}$  of either Kv3.1 or Kv1.5. Whereas Kv3.1 L401V had an  $IC_{50}$  indistinguishable from that of Kv3.1 WT, Kv1.5 V481L had a significantly lower  $IC_{50}$  than that of Kv1.5 WT. The most striking changes occurred with the isoleucine/leucine mutations in the S6 segment. The  $IC_{50}$  of Kv3.1 L422I was dramatically increased from that of Kv3.1 WT and approached the value of Kv1.5 WT. Similarly, the  $IC_{50}$  of Kv1.5 I502L was substantially decreased and approximated that of Kv3.1 WT. The full concentration-response relations for flecainide inhibition of the reciprocal isoleucine/leucine mutants and their respective WTs are shown in Fig. 6C. They indicate that the S6 isoleucine/leucine mutants transformed the flecainide-sensitivity phenotype of each subunit to resemble that of its opposite WT



counterpart. Table 2 shows the rate constants for leucine/isoleucine mutants compared to WT, and indicate that like the WT channels, the main differences among the mutants was in the  $k_{on}$ , suggesting that the differences in drug sensitivity were due to differences in drug access to the channel rather than stability of the drug-receptor complex.

#### **4-4 Biophysical Effects of the S6 Isoleucine/Leucine Mutations in Kv3.1 and Kv1.5.**

To evaluate changes in biophysical properties as potential mechanisms of altered flecainide-sensitivity of the S6 Kv3.1 and Kv1.5 mutants, we assessed the kinetics, activation voltage-dependence and reversal potentials of the currents carried by the various constructs. As shown in Table 3, despite the substantial changes in flecainide-sensitivity caused by the mutations, they did not affect the primary biophysical properties of the channels.

**4-5 Effects of Corresponding Mutations in Kv1.4 and Kv4.2.** The striking changes in Kv3.1 and Kv1.5 flecainide sensitivity caused by the S6 isoleucine/leucine mutations suggest a crucial role in determining the flecainide sensitivity differences between these subunits. To determine the role of the corresponding residues in Kv1.4 and Kv4.2, we made the equivalent point mutations in these subunits. The results are illustrated in Fig. 7. Figure 7A (left panels) shows currents recorded upon voltage steps from -80 mV in Kv4.2 WT, Kv4.2 with the S6 L492I mutation, Kv1.4 WT and Kv1.4 I547L. The right panels show currents recorded from the same oocytes after exposure to 50  $\mu$ M flecainide. Kv4.2 WT was clearly flecainide-sensitive and Kv1.4 WT flecainide-insensitive. The leucine to isoleucine mutation at position 392 abolished the response to 50  $\mu$ M flecainide

in Kv4.2, without obviously affecting current kinetics. On the other hand, the reciprocal mutation in Kv1.4 substantially increased flecainide sensitivity. Figure 7B shows the full concentration-response relations for the WT subunits and the isoleucine/leucine mutants at +30 mV. The mutations clearly reversed the flecainide-sensitivity differences, with curves for each point-mutated subunit superimposing on the curve of the opposite WT subunit. Overall, Kv4.2 WT exhibited marked sensitivity to flecainide with an  $IC_{50}$  of  $37.4 \pm 6.9 \mu\text{M}$ , compared to Kv1.4 WT which had an  $IC_{50}$  of  $706.3 \pm 37.2 \mu\text{M}$  ( $P < 0.001$  versus Kv4.2). The Kv1.4 I547L mutant  $IC_{50}$  was decreased to  $40.9 \pm 7.3 \mu\text{M}$  ( $P < 0.001$  versus Kv1.4 WT), whereas the flecainide  $IC_{50}$  of the Kv4.2 L392I mutant was  $628.3 \pm 35.5 \mu\text{M}$  ( $P < 0.001$  versus Kv4.2 WT).

## 5 Discussion

In this study, we have evaluated the basis for pharmacological sensitivity differences among four voltage-dependent K<sup>+</sup>-channel subunit channels. We find that a single, relatively conservative amino acid difference in S6 accounts for the variations in flecainide sensitivity.

**5-1 Comparison with Previous Studies of Molecular Determinants of Cardiac Ion-Channel Block.** Replacing a leucine with an isoleucine in corresponding positions of the S6 transmembrane domain conferred to the flecainide-sensitive channels Kv3.1 and Kv4.2 a flecainide affinity like that of the insensitive subunits Kv1.4 and Kv1.5. Mutating the equivalent isoleucine in Kv1.4 and Kv1.5 to a leucine conferred strongly-increased sensitivity similar to that of Kv3.1 and Kv4.2. These subunits possess highly-conserved S5, pore and S6 segments.

Several previous studies have examined molecular motifs in these subunits that determine antiarrhythmic drug binding (Caballero et al, 2002; Decher et al, 2004; Franqueza et al, 1997; Yeola et al, 1996). Yeola et al. (1996) were the first to examine the determinants of quinidine binding in Kv1.5. They noted that residues in the S6 segment, specifically T507 and V514, are significant determinants of quinidine block. Franqueza et al. (1997) showed that mutations at T507, L510 and V514 abolish stereoselectivity of bupivacaine block of Kv1.5. Caballero et al. (2002) examined the determinants of benzocaine block and low-concentration agonist activity on Kv1.5, and found that mutations of T479, T507, L510 and V514 abolish agonist actions but increase blocking effects. In a recent study, Decher et al. (2004) used alanine-scanning

mutagenesis to examine the role of 23 amino acids in the K<sup>+</sup>-signature sequence and S6 of Kv1.5 in sensitivity to the anthranilic acid derivative S0100176. Mutations at T479, T480, V505, I508 and V512 reduced drug sensitivity. An alanine mutation at I502, the critical site in the present study, slightly but significantly decreased sensitivity to S0100176. The authors concluded that specific S6 and pore helix residues facing the inner cavity form a binding pocket for S0100176. There is also evidence for a role of S6 residues in determining drug block of Kv1.4 channels. Substitutions at T529 alter sensitivity to quinidine and 4-aminopyridine (4AP), with a phenylalanine substitution in particular strongly reducing the affinity for quinidine (Zhang et al., 1998). Phenylalanine substitutions in the leucine heptad repeat region of the S4-S5 linker region stabilize the closed state of Kv1.4 and increase 4AP sensitivity (Judge et al., 2002).

There is evidence for an important role of S6 residues in governing drug block of other cardiac voltage-gated potassium channels. Mutations at S620 and S631 impair C-type inactivation of the rapid delayed-rectifier channel encoded by the *human ether-a-go-go-related gene* (HERG) and attenuate verapamil block (Zhang et al., 1999). Changes in HERG inactivation due to S6 mutations can be dissociated from alterations in blocking drug affinity, suggesting a primary role for modulation of drug affinity rather than state-dependent block (Lees-Miller et al., 2000). An elegant series of studies from Dr. Sanguinetti's laboratory have revealed the structural basis for HERG block, with cation- $\pi$  interactions involving critical S6 residues and tertiary nitrogens playing a central role (Mitcheson et al, 2000; Fernandez et al., 2004). Similarly, S6 domain residues are crucial determinants of drug block of the slow delayed-rectifier channel KvLQT1 (Seebahn et al., 2003), voltage-gated Na<sup>+</sup>-channels (Ragsdale et al., 1996; Sunami et al., 1997), and L-type Ca<sup>2+</sup>-channels (Hockerman et al., 1997).

**5-2 Model of Kv3.1 Channel Pore.** We used molecular modeling to evaluate the position of the critical leucine/isoleucine amino-acid residue in relation to key structural components of Kv3.1. The results of structural modeling (according to the approach described in the “Materials and Methods” section) are shown in Fig. 8. The overall structure of the S5-pore-S6 region of Kv3.1 is illustrated in a ribbon representation, with the surface of the L422 and V425 residues colored in yellow and red respectively. The V425 residue is seen as projecting inside part of the channel central cavity (Jiang et al., 2002). This residue has been shown to participate in the binding of a large number of inhibitory agents to several K<sup>+</sup> channels, including the voltage-gated Shaker (Liu et al., 1997) and the KCa3.1 (Wulff et al., 2001) channels. As the dimensions of the channel inner cavity (10Å) correspond to the computed length of a flecainide molecule, it is quite conceivable that flecainide interacts directly with the hydrophobic residues of the channel cavity, in particular V425. In contrast, the van der Waals surface of the key L422 residue appears to be projecting directly behind V425. Hence, our structural analysis does not support a direct interaction between flecainide and the residue at position 422; therefore, it is probably not part of the binding site *per se*. It is possible, however, that the L to I mutation at position 422 induces a repositioning of the V425 residue, thereby modifying the interaction between flecainide and residues such as V425 in the channel cavity. Alternatively, as seen in the model in Figure 8, L422 is located directly above the highly-conserved G424 residue that is generally considered to act as a gating hinge. This residue bends the inner helix by approximately 30 degrees in the crystal structure of MthK and is believed to provide part of the S6 segment flexibility required for Kv channel opening. It is thus possible that the L422I mutation alters the flexibility of the G424 region, thus modulating the rate at which flecainide has access to the channel inner cavity.

Figure 8 also includes the position of the hydrophilic L401 (green) and I389 (blue) residues, mutation of which failed to alter flecainide sensitivity of Kv3.1. The I389 residue is predicted to be located in the N-terminal end of the channel pore helix (blue) whereas the L401 residue is seen as part of the selectivity filter. Because I389 is more exposed to the external than internal medium, mutating this residue is not expected to affect the structure of the channel central cavity. However, according to the proposed model, the leucine at position 401 could indirectly modify the position of the cavity-lining T400 residue and thus affect flecainide binding. In fact, residues at positions equivalent to T400 have been implicated in drug binding (see for instance Wulff et al., 2001). However, mutation of L401 is not likely to result in a significant change in the T400 orientation due to the high rigidity of the filter region.

The predicted positions of the I389, L401, L422 and V425 residues depend on the validity of our homology-based models. In this regard, it should be pointed out that the structural features of the L401, L422 and V425 residues are conserved whether Kv3.1 is modeled with MthK (Figure 8) or with the closed KcsA channel structure as template (not shown). The structure of the S6 segment above the gating-hinge glycine residue thus appears to change minimally between the closed and the open conformation of K<sup>+</sup> channels, despite important structural changes in the C-terminal region of S6. However, in the absence of a crystal structure for mammalian voltage-gated K<sup>+</sup> channels, we cannot rule out the possibility that the orientation of the L422 and V425 residues differs from that predicted by the bacterial MthK and/or KcsA structures. Further studies to evaluate the potential structural basis for the role of the isoleucine/leucine moiety in determining flecainide sensitivity, as well as the importance of other residues in that region, would be of interest.

**5-3 Potential Importance of our Findings.** The difference in flecainide-sensitivity between Kv1.4 and Kv4.2 is well-recognized and consequently flecainide has been used as a tool to explore the potential molecular basis of native  $I_{to}$  (Yeola and Snyders, 1997; Han et al., 2000). Flecainide sensitivity differences have also been noted between canine  $I_{Kur}$  with properties of Kv3.1 (Yue et al., 2000) and native human Kv1.5-like  $I_{Kur}$  currents (Wang et al., 1995). The present study demonstrates a common molecular basis for these sensitivity differences: the presence of a leucine rather than an isoleucine at a key S6 amino-acid position in the flecainide-sensitive subunits.

Atrial fibrillation is the most common clinical arrhythmia and its treatment remains suboptimal (Nattel et al., 2002). Because of its atrial-selective localization, Kv1.5-based human  $I_{Kur}$  has been suggested to be a potentially-interesting target for new antiarrhythmic drug development (Wang et al., 1993). The present study was designed to shed light on the molecular determinant of reported differences seen between sensitive and insensitive subunits. The identification of a key amino-acid determinant is an important step in this direction. A better understanding of the molecular determinants of the drug-sensitivity of Kv1.5 and related channels may help in the rational design of new antiarrhythmic compounds.

**5-4 Potential Limitations.** The objective of this study was to determine the molecular basis for the differences in flecainide sensitivity among four subunits involved in forming native  $K^+$ -channels for which discrepancies in sensitivity have been noted and studied previously. We did not set out to establish the details of the molecular determinants of the drug-binding site for each individual subunit. Although the latter issue is of great

interest, it goes well beyond the scope of the present study. The S6+C-terminal chimeras containing the S6+C-terminal of Kv3.1 or Kv1.5 moved the flecainide sensitivity towards that of the subunit composition of the S6+C-terminal end. However, despite the fact that the S6+C-terminal contained the leucine/isoleucine moiety conferring flecainide sensitivity/insensitivity respectively in the respective wild types or point mutations, the changes in drug sensitivity were less with the chimeras than for the point mutations. This observation suggests that other molecular determinants in S6 and/or the C-terminus influence drug sensitivity in the chimeras, and can partly offset the effects of the leucine/isoleucine moiety.

The channel-blocking concentrations in this study are higher than those produced therapeutically, as well as values published in studies analyzing the effects of flecainide on  $I_{K_{ur,d}}$  in isolated atrial cells and in vivo models of AF (Yue et al., 2000b; Wang et al., 1992). This discrepancy is likely due to the well-recognized lesser sensitivity to blocking drugs of channels expressed in *Xenopus* oocytes compared to mammalian cells (Weerapura et al, 2002). Nevertheless, the mechanisms of channel block in *Xenopus* oocytes are believed to be similar to those in other systems and *Xenopus* oocytes are widely used as an expression system for the analysis of structural motifs for channel block (Decher et al., 2004; Dibb et al., 2003; Perry et al., 2004; Wang et al., 2003).

We used molecular modeling to evaluate the position of the critical leucine/isoleucine amino acid in relationship to key structural components of Kv3.1. We recognize that this modeling does not clarify the details of flecainide binding. As mentioned above, a full evaluation of the molecular structure of the drug-binding site goes beyond the scope of this study. In particular, further work is needed to delineate the amino acids that form the binding site and the mechanism of their interaction with the



critical leucine/isoleucine residue that we identified. Nevertheless, we feel that it is important to note the position of the leucine/isoleucine amino acid site in order to begin to assess potential mechanisms of its involvement. Further work will clearly be needed to reveal more of the details of flecainide's interactions with channels composed of Kv4.2, Kv3.1, Kv1.4 and Kv1.5 subunits.

## **6 Acknowledgments**

The authors thank Evelyn Landry and Xiaofan Yang for expert technical assistance and France Thériault for excellent secretarial help with the manuscript.

## 7 References

- Armstrong CM (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* **58**:413-437.
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, and Karplus M (1983) A Program for Macromolecular Energy Minimization and Dynamics Calculations. *J Comput Chem* **4**:187-217.
- Caballero R, Pourrier M, Schram G, Delpon E, Tamargo J, and Nattel S (2003) Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents: voltage dependence and role of S6 valines. *Br J Pharmacol* **138**: 1475-1484.
- Caballero R, Moreno I, Gonzalez T, Valenzuela C, Tamargo J, and Delpon E (2002) Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* **56**:104-117.
- Decher N, Pirard B, Bundis F, Peukert S, Baringhaus KH, Busch AE, Steinmeyer K, and Sanguinetti MC (2004) Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **279**:394-400.
- Dibb KM, Rose T, Makary SY, Claydon TW, Enkvetchakul D, Leach R, Nichols CG, and Boyett MR (2003) Molecular basis of ion selectivity, block, and rectification of the inward rectifier Kir3.1/Kir3.4 K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **278**:49537-49548.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
- Fedida D, Eldstrom J, Hesketh JC, Lamorgese M, Castel L, Steele DF, and Van Wagoner DR (2003) Kv1.5 is an important component of repolarizing K<sup>+</sup> current in canine atrial myocytes. *Circ Res* **93**:744-751.

- Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, and Nattel S (1997) Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* **80**:572-579.
- Fernandez D, Ghanta A, Kauffman GW, and Sanguinetti MC (2004) Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem* **279**:10120-10127.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, and Valenzuela C (1997) Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* **81**:1053-1064.
- Han W, Wang Z, and Nattel S (2000) A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **279**:H466-H474.
- Herrera D, Yue L, Wang Z, and Nattel S (2002) Effects of antiarrhythmic drugs on currents carried by dKv3.1 and hKv1.5. *Biophys J* **82**:585a. Abstract
- Hockerman GH, Johnson BD, Abbott MR, Scheuer T, and Catterall WA (1997). Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit. *J Biol Chem* **272**:18759-18765.
- Hughey R and Krogh A (1996) Hidden Markov models for sequence analysis: extension and analysis of the basic method. *Comput Appl Biosci* **12**:95-107.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**:523-526.

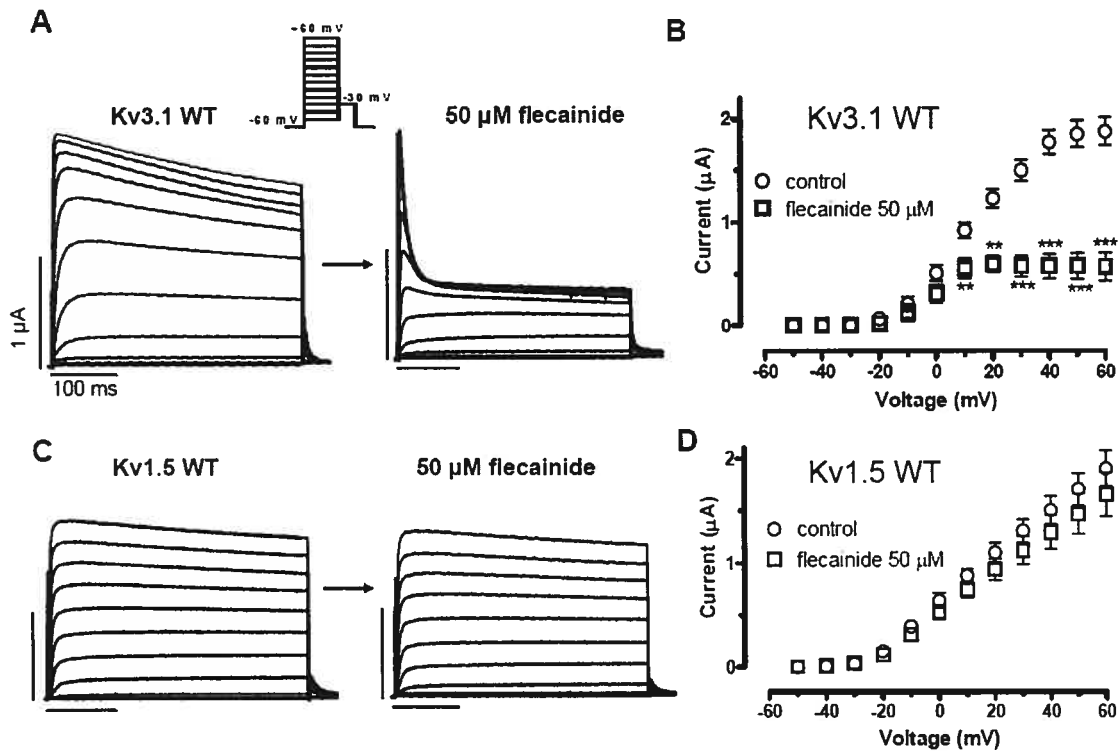
- Judge SI, Yeh JZ, Goolsby JE, Monteiro MJ, and Bever CT Jr (2002) Determinants of 4-aminopyridine sensitivity in a human brain Kv1.4 K(+) channel: phenylalanine substitutions in leucine heptad repeat region stabilize channel closed state. *Mol Pharmacol* **61**:913-920.
- Laskowski BR, MacArthur MW, Moss DS, and Thornton JM (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26**:283-291.
- Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, and Duff HJ (2000) Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol* **57**:367-374.
- Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, and Yellen G (1997) Gated access to the pore of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **19**:175-184.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, and Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12329-12333.
- Nattel S, Khairy P, Roy D, Thibault B, Guerra P, Talajic M, and Dubuc M (2002) New approaches to atrial fibrillation management: a critical review of a rapidly evolving field. *Drugs* **62**:2377-2397.
- Nattel S, Yue L, and Wang Z (1999) Cardiac ultrarapid delayed rectifiers, a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* **9**:217-226.
- Perry M, de Groot MJ, Helliwell R, Leishman D, Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC, and Mitcheson J (2004) Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol Pharmacol* **66**:240-249.

- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, and Catterall WA (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9270-9275.
- Roden DM and George AL Jr (1997) Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol* **273**:H511-H525.
- Sali A and Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**:779-815.
- Seeböhm G, Chen J, Strutz N, Culbertson C, Lerche C, and Sanguinetti MC (2003) Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol Pharmacol* **64**:70-77.
- Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **42**:377-390.
- Sunami A, Dudley SC Jr, and Fozzard HA (1997) Sodium channel selectivity filter regulates antiarrhythmic drug binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14126-14131.
- Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, and Delpon E (2004) Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **62**:9-33.
- Varro A, Biliczki P, Iost N, Virag L, Hala O, Kovacs P, Matyus P, and Papp JG (2004). Theoretical possibilities for the development of novel antiarrhythmic drugs. *Curr Med Chem* **11**:1-11.
- Wang S, Morales MJ, Qu YJ, Bett GC, Strauss HC, and Rasmusson RL (2003) Kv1.4 channel block by quinidine: evidence for a drug-induced allosteric effect. *J Physiol* **546**:387-401.

- Wang Z, Fermini B, and Nattel S (1995) Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **272**:184-196.
- Wang Z, Fermini B, and Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* **73**:1061-1076.
- Wang Z, Pagé P, and Nattel S (1992) Mechanism of flecainide's antiarrhythmic action in experimental atrial fibrillation. *Circ Res* **71**:271-287.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, and Hébert TE (2002) A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol (Lond)* **540**:15-27.
- Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagona G, Profeta S, and Weiner P (1984) A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Amer Chem Soc* **106**:765-784
- Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, and Chandy KG (2001) Delineation of the clotimazol/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* **276**:30240-30245.
- Yamagishi T, Ishii K, and Taira N (1995) Antiarrhythmic and bradycardic drugs inhibit currents of cloned K<sup>+</sup> channels, Kv1.2 and Kv1.4. *Eur J Pharmacol* **281**:151-159.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, and Snyders DJ (1996) Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* **78**:1105-1114.

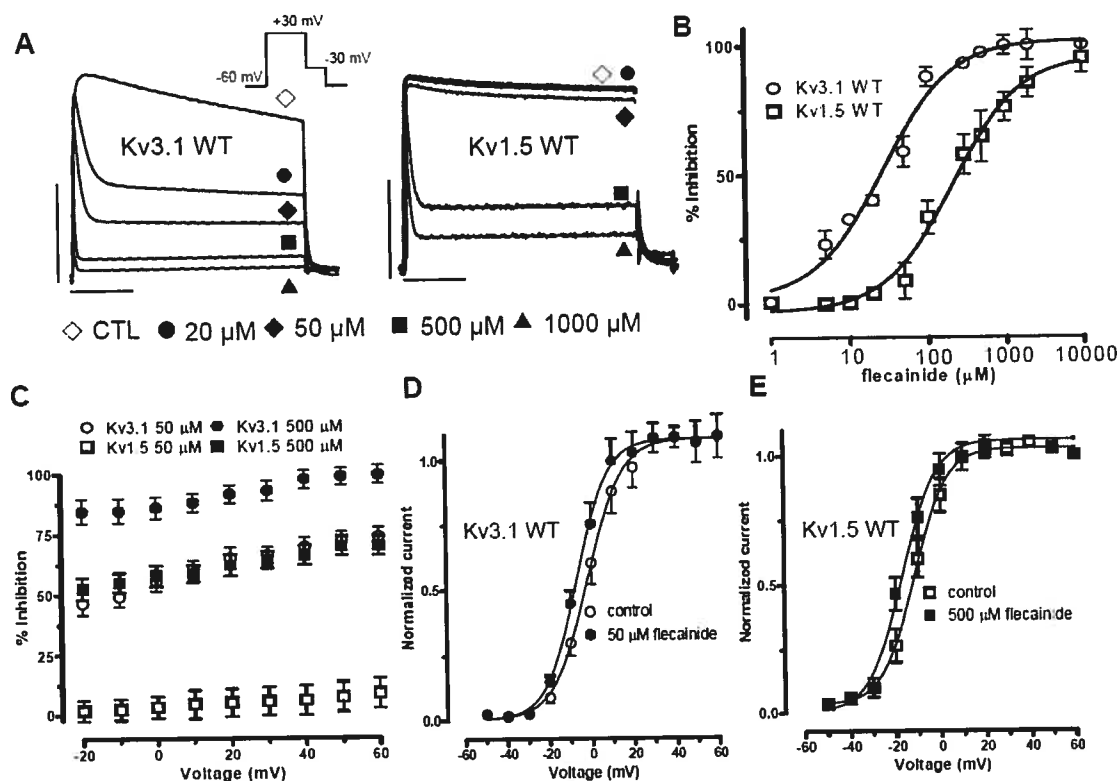
- Yeola SW and Snyders DJ (1997) Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res* **33**:540-547.
- Yue L, Feng J, Li GR, and Nattel S (1996) Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol (Lond)* **496**:647-662.
- Yue L, Wang Z, Rindt H, and Nattel S (2000a) Molecular evidence for a role of Shaw (Kv3) potassium channel subunits in potassium currents of dog atrium. *J Physiol* **527**:467-478.
- Yue L, Feng JL, Wang Z, and Nattel S (2000b) Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* **46**:151-161.
- Zhang H, Zhu B, Yao JA, and Tseng GN (1998) Differential effects of S6 mutations on binding of quinidine and 4-aminopyridine to rat isoform of Kv1.4: common site but different factors in determining blockers' binding affinity. *J Pharmacol Exp Ther* **287**:332-343.
- Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* **84**:989-998.

## 8 Figures and Figure Legends

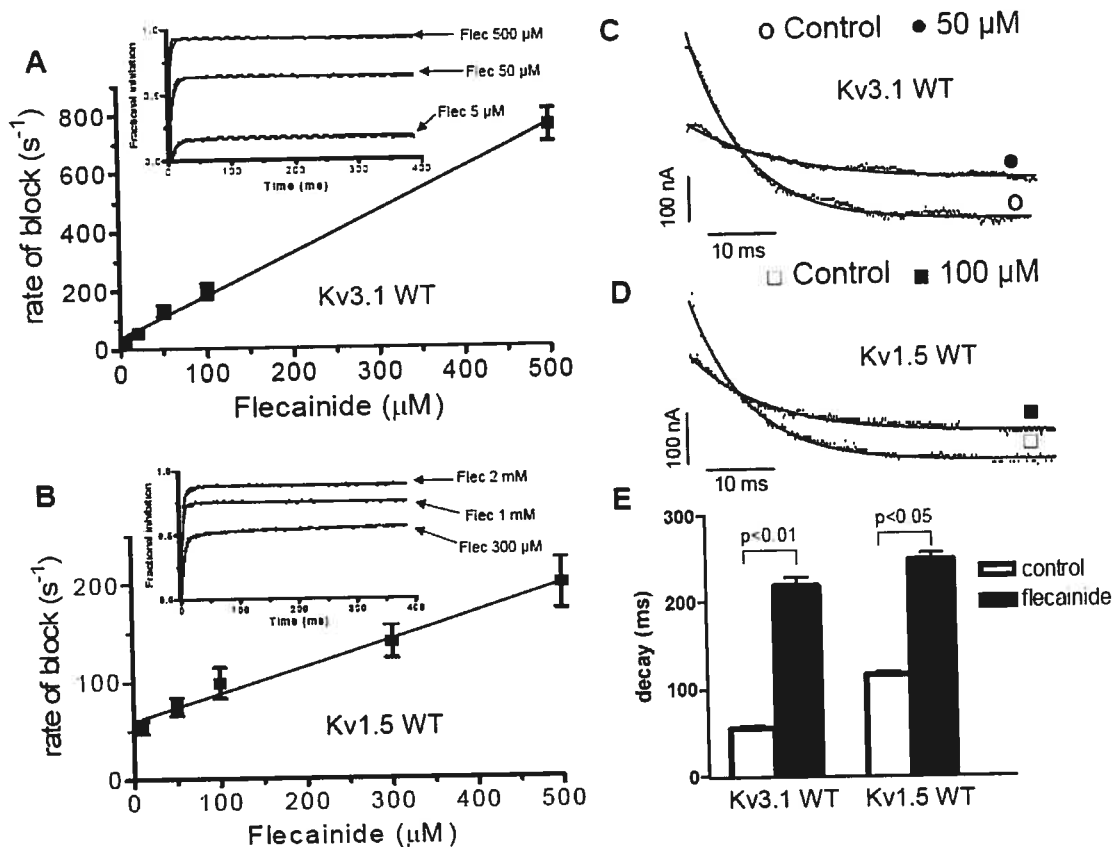


**Figure 1:** Flecainide inhibition of Kv3.1 and Kv1.5 currents expressed in *Xenopus* oocytes ( $n=8$  per observation). Kv3.1 (A) and Kv1.5 (C) currents induced by depolarization to potentials ranging from -50 mV to +60 mV from a holding potential of -60 mV in the absence and presence of 50  $\mu$ M flecainide. Inset shows the voltage-clamp protocol used to elicit currents. Vertical scales represent 1  $\mu$ A and horizontal scales 100 ms. Current-voltage relationships for Kv3.1 (B) and Kv1.5 (D) currents in the absence ( $\circ$ ) and presence of 50  $\mu$ M flecainide ( $\square$ ) (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus control).

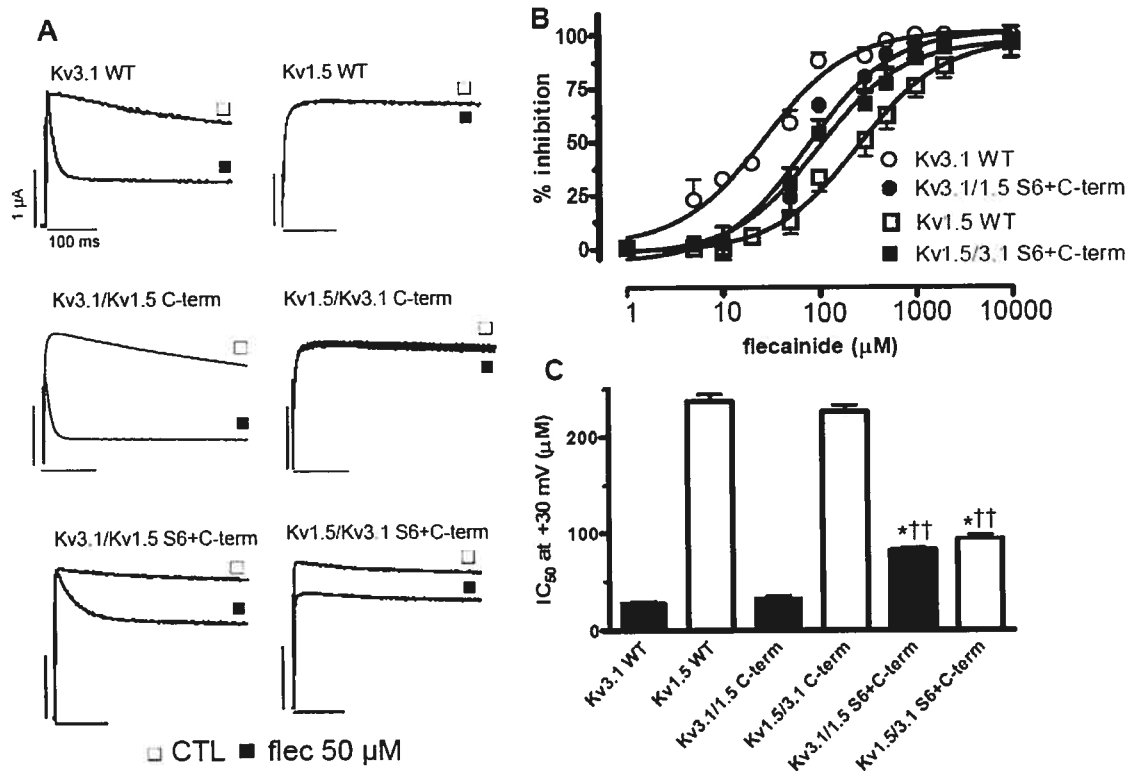




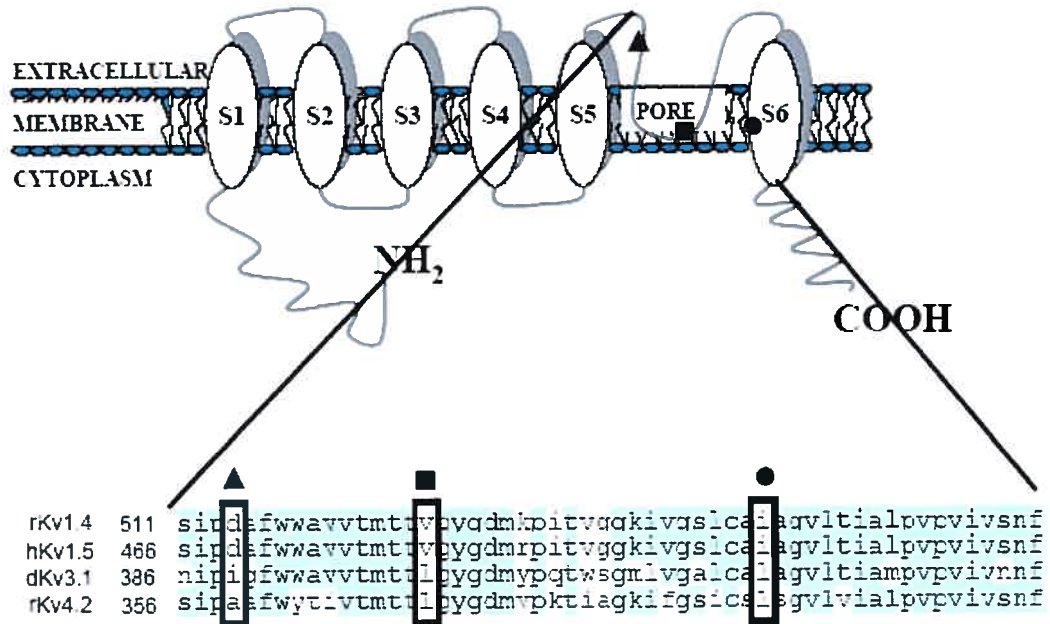
**Figure 2:** *A*, effects of four concentrations of flecainide on currents recorded in representative oocytes expressing Kv3.1 and Kv1.5 (protocol in inset). Note that all recordings before and after drug were in the same oocyte. Vertical scales represent 1  $\mu$ A and horizontal scales 100 ms. *B*, concentration-response curves for Kv3.1 and Kv1.5 (mean $\pm$ S.E.M.) for effects of flecainide upon steps to +30 mV ( $n=8$  per observation). *C*, percentage reduction (mean $\pm$ S.E.M.) in Kv3.1 and Kv1.5 as a function of test potential at 50 and 500  $\mu$ M flecainide. *D*, *E*, activation voltage-dependence of Kv3.1 and Kv1.5 currents under control conditions and in the presence of 50 and 500  $\mu$ M flecainide respectively, as determined based on the tail current at -30 mV following steps to each of the voltages indicated normalized to the tail current after a step to +60 mV ( $n=8$  per observation).



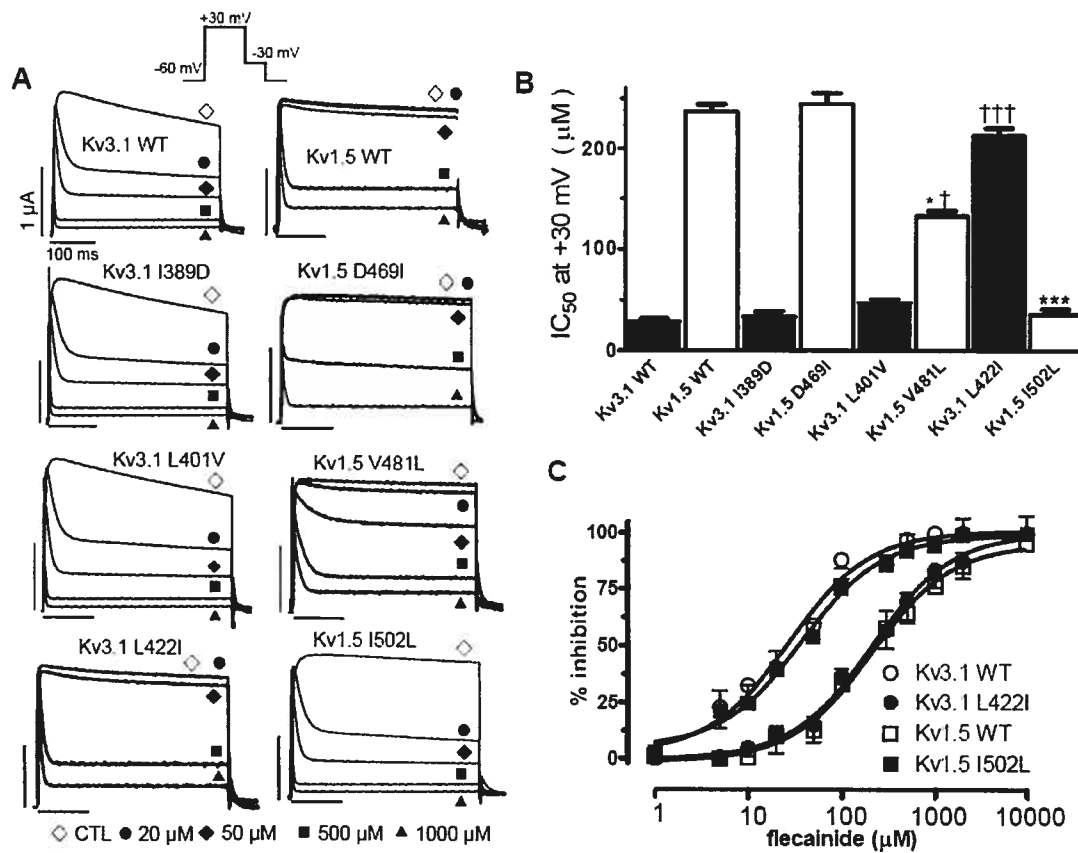
**Figure 3:** Time-dependent flecainide effects. *A*, *B*, mean $\pm$ S.E.M. blocking rate constants (determined as illustrated in insets) were a linear function of flecainide concentration ( $n=8$  oocytes/data point). Insets: fractional inhibition of Kv3.1 (*A*) and Kv1.5 (*B*) current produced by the flecainide concentration indicated relative to control (given by  $[(I_{\text{Ctl}} - I_{\text{Flec}})/I_{\text{Ctl}}]$ ) are shown as a function of time during voltage steps to +30 mV. Original data are shown, as well as best-fit exponentials to determine the rate constants for block onset. *C*, *D*, tail currents were elicited upon repolarisation to -30 mV following pulses to +60 mV from a holding potential of -60 mV. Kv3.1 (*C*) and Kv1.5 (*D*) deactivation currents (tail currents) in the absence and presence of the indicated flecainide concentration. *E*, summary data (mean $\pm$ SEM) of time course of deactivation in the absence and presence of flecainide concentrations indicated in panels *C* and *D* (results were obtained in 8 oocytes per construct).



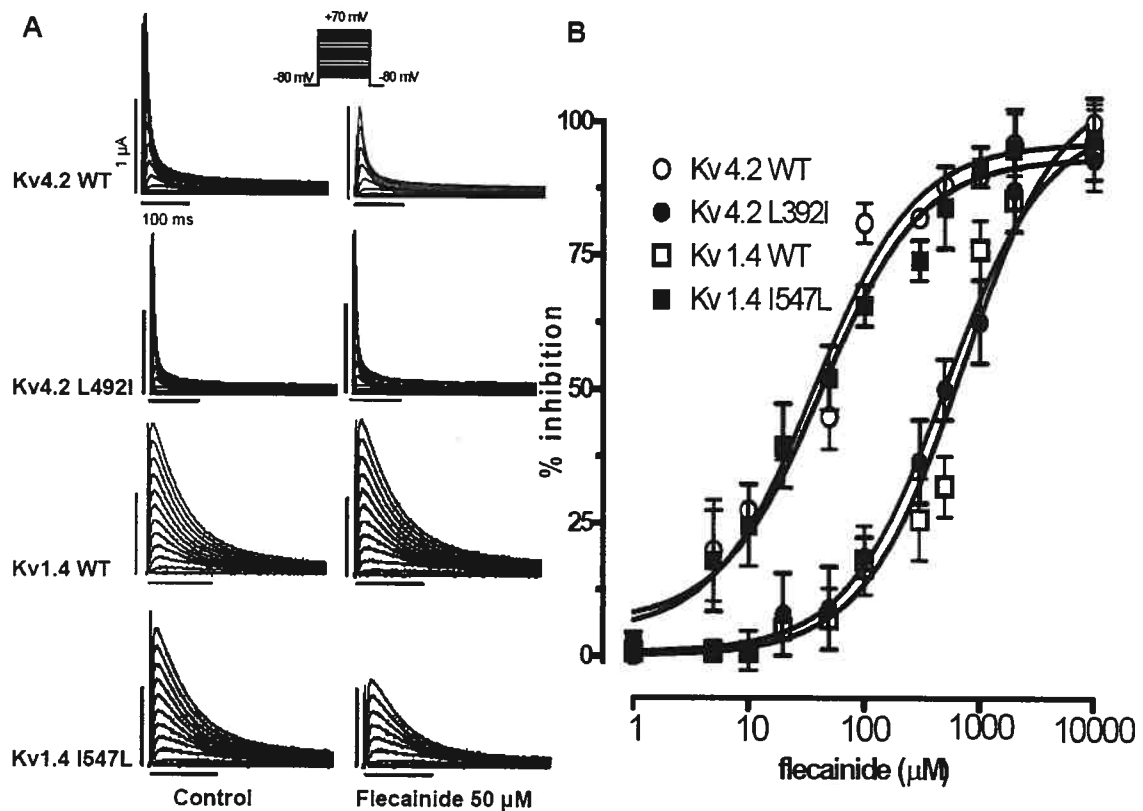
**Figure 4:** Effects of flecainide on currents carried by WT and chimeric subunits. **A**, current recordings in absence and presence of 50  $\mu\text{M}$  flecainide. **B**, concentration-response curves for Kv3.1 WT, Kv3.1 with the Kv1.5 S6 and C-terminal (Kv3.1/Kv1.5 S6+C-term), Kv1.5 WT and Kv1.5 with the Kv3.1 S6 and C-terminal (Kv1.5/Kv3.1 S6+C-term). **C**, IC<sub>50</sub>s for flecainide effects on currents upon application of a pulse to +30 mV. (\* $P < 0.05$  versus Kv3.1 WT; ††  $P < 0.01$  versus Kv1.5 WT, N ranges from 6 to 8). Vertical calibrations are 1  $\mu\text{A}$  and horizontal calibrations are 100 ms. (Kv3.1/1.5C-term=chimera formed by substituting Kv1.5 C-terminal into Kv3.1; Kv1.5/3.1C-term=chimera formed by substituting Kv3.1 C-terminal into Kv1.5).



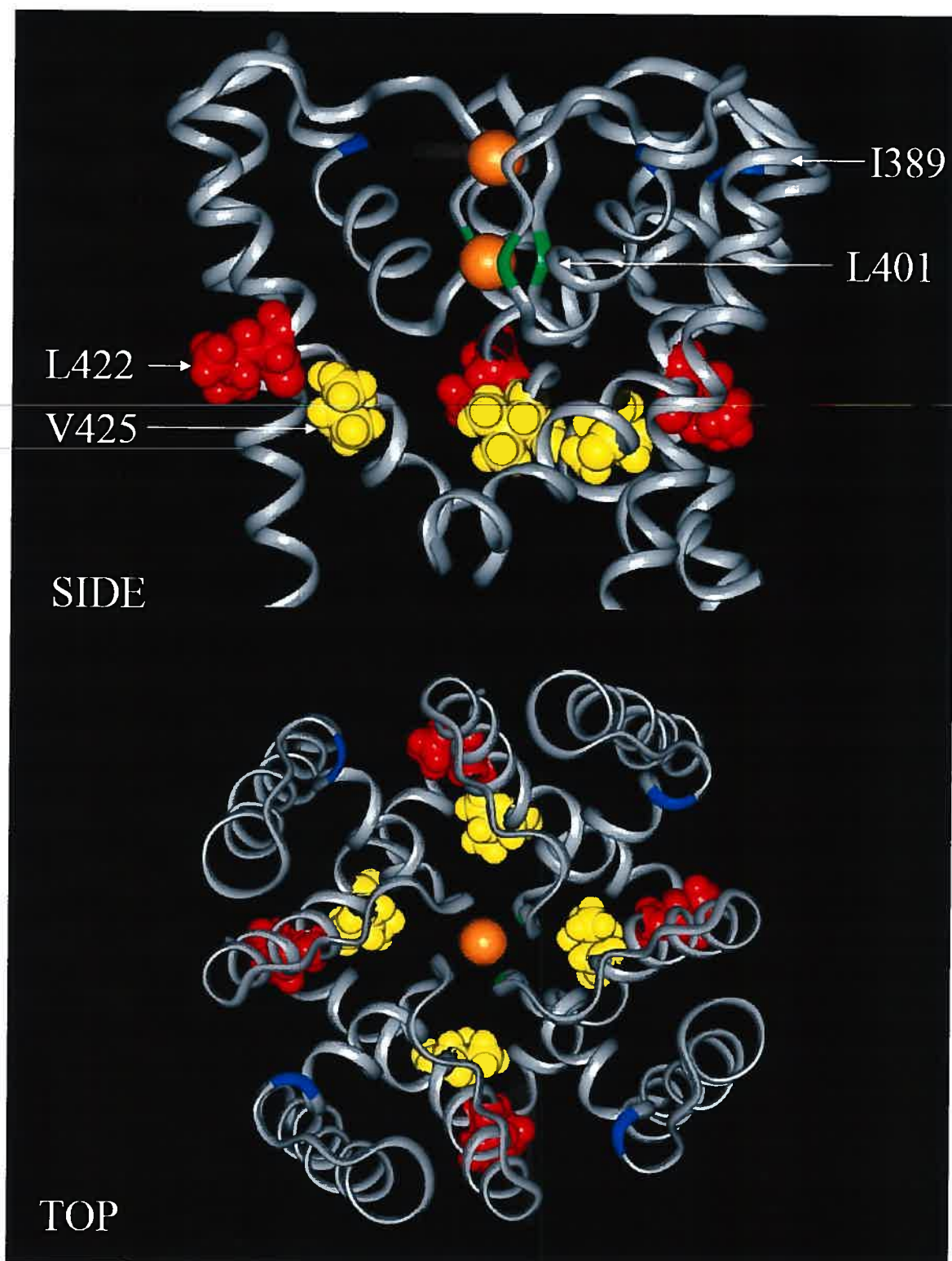
**Figure 5:** Amino-acid sequence comparison of the region between the beginning of the S5-S6 linker and S6 in dKv3.1, hKv1.5, rKv4.2 and rKv1.4. Residues selected for mutation analysis are boxed.



**Figure 6:** *A*, effects of four concentrations of flecainide on currents recorded in representative oocytes expressing WT and various mutant constructs of Kv3.1 (left) and Kv1.5 (right) (voltage protocol in inset). Vertical calibrations are 1  $\mu$ A and horizontal calibrations are 100 ms. *B*, mean $\pm$ S.E.M. IC<sub>50</sub>s for WT and mutant constructs (\* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 versus. Kv1.5WT; † $P$ <0.05, ††† $P$ <0.001 versus Kv3.1 WT, n ranges from 6 to 8 per data point). *C*, concentration-response curves for WT and isoleucine/leucine mutants mean $\pm$ S.E.M. for effects of flecainide upon steps to +30 mV (n ranges from 6 to 8 per data point).



**Figure 7:** Effects of flecainide on  $I_{to}$ -forming subunits. **A**, current recordings of Kv4.2 WT, Kv4.2 L492I, Kv1.4 WT and Kv1.4 I547L in the absence (left panels) and presence (right panels) of 50  $\mu\text{M}$  flecainide (recordings before and after drug were always obtained in the same oocyte). **B**, concentration-response curves for flecainide inhibition of currents elicited by depolarization to +30 mV. Vertical calibrations are 1  $\mu\text{A}$  and horizontal calibrations are 100 ms.



**Figure 8:** Homology model of the Kv3.1 pore. Structural model of the Kv3.1 pore region obtained by homology modeling using the MthK crystal structure as template (PDB: 1LNQ). Top and side views of the predicted Kv3.1 channel S5-Pore-S6 region shown in a ribbon representation. The channel selectivity filter is illustrated containing two K<sup>+</sup> ions (orange). The L422 (red) and the cavity lining residue V425 (yellow) are represented as van der Waals surfaces. Only three of the four monomers have been included in the side view representation of the channel for clarity. This model predicts that the L422 residue is positioned behind V425. As a result L422 is not expected to face the channel central cavity and thus to interact directly with flecainide. The position of the hydrophilic L401 and I389 residues has been marked in green and blue respectively. The I389 residue is predicted to be located in the N-terminal end of the channel pore helix (blue) whereas the L401 residue is seen as part of the selectivity filter. Mutation of these residues is not expected to affect the structure of the channel central cavity where most likely binding of flecainide takes place.



## 9 Tables

**Table 1: Primers used for chimera and point mutation construction**

Clone	Primers and Annealing Temperatures in °C	RES
Kv3.1I389D	1. CTGCCCCAACAAGATAGAGTTCAT 2. CAGAAGCCATCGGGGATGTTCTTAAAGTGGG } 57 3. GTCATGGTGACCACGGCCACCAGAAGCCATCGGGGA } 55	<i>MscI</i> <i>BstEII</i>
Kv1.5D469I	1. AGCGGGGTCATGGCCCCGCCCTCT 2. ACCAGAAGGCGATAGGGATGCTAG } 60 3. CATGGTGACCACTGCCACCAGAAGGCGATAGGGATGC } 59	<i>PmlI</i> <i>BstEII</i>
Kv3.1L401V	1. ATGACGACGGTGGGCTACGGAGAC 2. GCCCGTGGTCACCATGACGACGGTGGGCTAC } 54 3. ATCGGATCCTCAAGTCACTCTCAC } 54	<i>BstEII</i> <i>BamHI</i>
Kv1.5V481L	1. AGTGGTCACCATGACCACTCTGGGCTACGGGGA 2. CATGATATCTCACAAATCTGTTTCCCGCT } 58	<i>BstEII</i> <i>EcoRV</i>
Kv3.1L422I	1. GCACTGTGTGCGATAGCGGGCGTGCTG 2. ATCGGATCCTCAAGTCACTCTCAC } 53	<i>BstAPI</i> <i>BamHI</i>
Kv1.5I502L	1. TCCAGTGCCGTCTACTTCGCA 2. AGGACCCCGGCGAGGGCACACAGCGAG } 57 3. GCTGTGTGCCCTCGCCGGGGTCTCAC } 57 4. CATGATATCTCACAAATCTGTTTCCCGCT } 59	<i>BstEII</i> <i>EcoRV</i>
Kv4.2L392I	1. GGCCCTGGTGTCTACTATGT 2. GACCAAGACTCCGCTAATTGAGCAGAT } 53 3. GGGTCTATCTGCTCAATTAGCGGAGTC 4. ATAGTTTAGCGGCCGCTTTACAAAGCAGACAC } 49 } 54	<i>BsmBI</i> <i>NotI</i>
Kv1.4I547L	1. GCAGAGGCAGATGAACCTACC } 53 2. TAAGACACCCGCAAGGGCACACAG } 54 3. GGGTCCCTGTGTGCCCTTGC GG GTGTC } 52 4. GATGGATCCTCAGACGTCAGTCTC	<i>BsmI</i> <i>BamHI</i>
Kv3.1/ Kv1.5S6- Cterm	1. CAAGATAAGCTTATGGGCCAAGGGGACGAGAGCGAG 2. CCCGGCGATGGCACACAGCGAGCCCACGATCATGCCG GACCACGTCTGCGGGTA } 63 3. GACATGTACCCGCAGACGTGGTCCGGCATGATCGTGG GCTCGCTGTGTGCCATC } 63 4. ACGAATGAGCTCTCACAAATCTGTTTCCCGCTGGT } 61	<i>HindIII</i> <i>SacI</i>
Kv1.5/ Kv3.1S6- Cterm	1. CAAGATAAGCTTATGGAGATCGCCCTGGTGCCCTG 2. GCCCGCCAGCGCACACAGTGCTCCCACCAGCTTGCC CCCAACAGTGATGGCCT } 63 3. GACATGAGGCCATCACTGTTGGGGCAAGCTGGTG GGAGCACTGTGTGCGCTG } 61 4. ACGAATGGATCCTCAAGTCACTCTCACAGCCTCTGT	<i>HindIII</i> <i>BamHI</i>
Kv3.1/ Kv1.5Cterm	1. ATAGGGGCCAGCCCAATGAC } 59 2. CACGATGACGGGCACAGGCAT } 49 3. GTTGAAGTTGGACACGATGACGGG } 54 4. TCCAACCTCAACTACTTCTACCACCGG } 59 5. ACGAATGAGCTCTCACAAATCTGTTTCCCGCTGGT } 53 6. CCCGTCATCGTGTCCAACCTCAACTACTTCTAC	<i>BstEII</i> <i>SacI</i>
Kv1.5/ Kv3.1Cterm	1. TCCAGTGCCGTCTACTTCGCA 2. GACGATGACGGGCACAGGCAG } 57 } 48 3. CCCAAAATTGTTGACGATGACGGG } 57 } 48 4. AACAATTTTGGGATGTATTACTCC } 54 } 55 5. ACGAATGGATCCTCAAGTCACTCTCACAGCCTCTGT } 54 } 54 6. CCCGTCATCGTCAACAATTTGGGATGTATTACTCC	<i>BstEII</i> <i>BamHI</i>

RES: Restriction Endonuclease Sites

**TABLE 2 : Rate constants for wild-type and mutant channels.**

Channel	$k_{\text{on}}(\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{off}}(\text{s}^{-1})$	$K_{\text{d}}(\mu\text{M})$
Kv3.1 WT	1.4±0.1	39.8±5.3	28.8±3.6
Kv3.1 L422I	0.37±0.05	73.2±4.5	202.7±11.7
Kv1.5 WT	0.30±0.02	60.0±5.5	210.8±5.9
Kv1.5 I502L	1.1±0.3	36.7±1.6	35.4±1.9

**TABLE 3. Biophysical properties of wild-type and mutant clones**

Clone	$V_{1/2}$ (mV)	$k$ (mV)	$\tau_{-10\text{mV}}$ (ms)	$\tau_{+30\text{mV}}$ (ms)	$V_{\text{rev}}$ (mV)
Kv3.1	$-1.7 \pm 0.4$	$8.2 \pm 1.1$	$19.4 \pm 1.5$	$3.9 \pm 0.5$	$-78 \pm 3.2$
Kv3.1L422I	$-2.1 \pm 0.5$	$8.0 \pm 1.5$	$18.7 \pm 1.9$	$3.5 \pm 0.9$	$-76 \pm 4.8$
Kv1.5	$-11.6 \pm 1.8$	$7.2 \pm 1.2$	$9.8 \pm 1.1$	$2.7 \pm 0.3$	$-73 \pm 3.4$
Kv1.5I502L	$-10.3 \pm 1.7$	$7.0 \pm 1.4$	$9.6 \pm 1.6$	$2.5 \pm 0.6$	$-74 \pm 4.6$

$V_{1/2}$  = 50% activation voltage;  $k$  = slope factor of activation curve;  $\tau_{-10\text{mV}}$ ,  $\tau_{+30\text{mV}}$  = activation time constants at -10 and +30 mV respectively,  $V_{\text{rev}}$  = reversal potential based on reversal of tail currents following a 25 ms activating pulse to +30 mV

**TROISIÈME PARTIE:**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE ET**  
**CONCLUSION**

Cette étude a tentée d'évaluer la base moléculaire des différences dans la sensibilité à la flécainide parmi quatre sous unités formant des canaux potassiques dépendants du voltage. On trouve qu'un simple résidu relativement bien conservé dans le segment transmembranaire S6 joue un rôle critique dans la sensibilité à la flécainide intrinsèque de ces canaux.

### **1 Comparaison à d'autres études des déterminants moléculaires du bloc de canaux ioniques cardiaques**

Le remplacement d'une leucine avec une isoleucine en position correspondante du segment transmembranaire S6 confère aux canaux sensibles Kv3.1 et Kv4.2, une sensibilité à la flécainide comme celle des canaux insensibles Kv1.4 et Kv1.5. Cet effet est réciproque et produit des canaux aillant une sensibilité semblable à celles de Kv3.1 et Kv4.2 de type sauvage lorsqu'on introduit une leucine à la position de l'isoleucine.

Plusieurs études ont examinées les motifs moléculaires de ces sous unités qui déterminent la liaison d'agents antiarythmiques. Yeola et ses collaborateurs<sup>(374)</sup>, étaient premier à examiner les déterminants de la liaison de la quinidine au canaux produits par la sous unité Kv1.5. Ils remarquèrent que des résidus dans le segment transmembranaire S6, notamment; la Thr505 et la Val512, sont déterminants du bloc par la quinidine. Une autre étude démontra que des mutations à la Thr505, la Leu508 et à la Val512 abolissent la stéréosélectivité du bloc de la sous unité Kv1.5 par la bupivacaine<sup>(375)</sup>. Caballero et al<sup>(376)</sup> ont examiné les déterminants du bloc par la benzocaine et son effet agoniste sur Kv1.5 à des basses concentrations. Ils ont trouvé que des mutations à la Thr477, Thr505, Leu508 et Val512 abolissaient l'action agoniste et réduisaient les effets bloqueurs. Une

étude récente employant la méthode de mutagenèse par substitution à l'alanine pour déterminer le rôle de 23 acides aminés, dans la séquence du filtre de sélectivité et le segment S6 de la sous unité Kv1.5, dans la sensibilité à l'agent S0100176<sup>(377)</sup>, démontra que des mutations à la Thr479, Thr480, Val505, Ile508 et Val512 réduisent la sensibilité à cette drogue. Ainsi, une mutation à l'alanine dans la position Ile502, le site critique dans notre modèle, a eu l'effet de réduire la sensibilité de Kv1.5 à S0100176. Ils conclurent que des résidus spécifiques du S6 et de l'hélice du pore, faisant face au centre de la voie de conduction, forment un complexe de liaison pour cet agent.

Le rôle du segment S6 comme déterminant du bloc des canaux Kv1.4 a déjà été mis en évidence, une substitution à la Thr529 change la sensibilité de ce canal à la quinidine et au 4AP. Lorsque des phénylalanines sont introduits le canal devient fortement insensible à la quinidine<sup>(378)</sup>. Introduction de phénylalanines dans les répétitions heptades leucine de la séquence liant le segment S4 au segment S5 tendent à stabiliser le canal Kv1.4 en configuration fermé et augmente sa sensibilité au 4AP<sup>(379)</sup>.

Des mutations aux résidus Ser620 et Ser631 abolissent l'inactivation de type C de la composante rapide du courant potassique sortant retardé à rectification, de plus ces mutations atténuent le bloc par la vérapamil<sup>(380)</sup>. Les résidus du S6 sont d'une importance catégorique dans la détermination du bloc de la composante lente du courant potassique sortant retardé à rectification encodé par KvLQT1<sup>(381)</sup>, les canaux sodiques voltage dépendants<sup>(382;383)</sup>, et les canaux calciques voltage dépendants de type L<sup>(384)</sup>.

## 2 Limites potentielles de nos études électrophysiologiques dans le système d'expression d'ovocytes de *Xénopes*

Nous avons visé durant nos travaux l'étude des propriétés pharmacologiques de certains canaux potassiques. Nous avons décidé d'utiliser le système d'expression hétérologue de l'ovocyte de *Xénopes* à cause de sa capacité de traduire l'ARN injectée en protéines.

Ce système comprend quelques avantages. Premièrement, nous pouvons prélever des centaines de cellules d'une grenouille durant une chirurgie. Cette chirurgie se déroule sans complications et l'animal ne doit pas être sacrifié. Donc une même grenouille peut nous procurer des milliers d'ovocytes sur plusieurs semaines d'expériences. Ces cellules, une fois isolées sont facilement maintenues et peuvent survivre jusqu'à deux semaines *in vitro* et peuvent être soumise à plusieurs microponctures de microélectrodes et de pipettes d'injection. Les ovocytes de *Xénopes* ont très peu de canaux endogènes, et ceci permet l'étude d'un canal particulier en isolation presque parfaite. Puisque l'ARN utilisée dans les expériences dans le système d'ovocytes est injectée directement dans le cytosol cellulaire et cette ARN est traduite en protéine par la machinerie intrinsèque de l'ovocyte, l'expression protéique est plus facilement contrôlable que par la transfection de cellules mammifères à l'aide de la lipofectamine. C'est-à-dire que l'injection d'une concentration plus haute d'ARN se traduira en une plus haute expression de la protéine

Ce système d'expression, par contre, a tout de même quelques désavantages; les canaux endogènes, malgré leur petit nombre, peuvent interférer avec les mesures de courant si ces derniers sont petits. Le processus de modifications post-traductionnelles peut être différent dans l'ovocyte comparé aux cellules natives. Donc les canaux

pourraient fonctionner différemment dans leur environnement naturel. De plus, les ovocytes peuvent démontrer une grande variabilité saisonnière telle que l'expression des canaux se fasse plus difficilement durant la saison estivale.

Malgré les désavantages, plusieurs études ont été publiées récemment dans des revues scientifiques telles que *Journal of Biological Chemistry*<sup>(377;385)</sup> et *Molecular Pharmacology*<sup>(381;386)</sup> trouvant que les courants exprimés dans les ovocytes ne diffèrent pas beaucoup de ceux exprimés dans des lignées cellulaires mammifères.

### 3 Directions futures

Dans cette étude nous avons pu élucider la base moléculaire de la différence de la sensibilité à la flécainide des sous unités Kv1.4, Kv1.5, Kv3.1 et Kv4.2. Les canaux exprimant une leucine seraient relativement sensible à la flécainide et les canaux montrant une isoleucine seraient relativement insensible.

Nos études nous mènent à investiguer si cette stratégie ne pourrait être utile dans l'étude de la structure fonction d'autres canaux. Plusieurs questions nous viennent à l'esprit. Est-ce que ce motif est commun pour tous les canaux Kv? Pouvons nous prédire l'effet de la flécainide sur certains canaux en portant attention à la nature du résidu dont ses derniers expriment? Est-ce que la flécainide reconnaît un motif spécifique sur certains canaux plus que sur d'autres? Y aurait-il d'autres résidus importants sur la protéine déterminant la sensibilité à la flécainide?

La figure 10 montre un alignement des séquences protéiques des canaux Kv. Nous constatons immédiatement qu'il y a remarquable conservation du résidu en question dans chacune des familles. Les membres des familles Kv1 et Kv2 expriment une



isoleucine, tandis que les membres des familles Kv3, Kv4 et Kv5 ainsi que Kv6 expriment une leucine, par contre la sous unité Kv6.3 exprime une valine. Un des membres de la famille Kv7 contient aussi une valine et Kv8.2 exprime une alanine. Il est remarquable qu'une trentaine de sous unités aient une si haute homologie de ce résidu dans le segment transmembranaire S6.

Kv1.1	G	Y	G	D	M	Y	P	V	T	I	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.2	G	Y	G	D	M	V	P	T	T	I	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.3	G	Y	G	D	M	H	P	V	T	I	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.4	G	Y	G	D	M	K	P	I	T	V	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.5	G	Y	G	D	M	R	F	I	T	V	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.6	G	Y	G	D	M	Y	P	M	T	V	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv1.7	G	Y	G	D	M	A	P	V	T	V	G	G	K	I	V	G	S	L	C	A	I	A	G	V	L	T
Kv2.1	G	Y	G	D	I	Y	P	K	T	L	L	G	K	I	V	G	G	L	C	C	I	A	G	V	L	V
Kv2.2	G	Y	G	D	I	Y	P	K	T	L	L	G	K	I	V	G	G	L	C	C	I	A	G	V	L	V
Kv3.1	G	Y	G	D	M	Y	P	Q	T	W	S	G	M	L	V	G	A	L	C	A	L	A	G	V	L	T
Kv3.2	G	Y	G	D	M	Y	P	Q	T	W	S	G	M	L	V	G	A	L	C	A	L	A	G	V	L	T
Kv3.3	G	Y	G	D	M	Y	P	K	T	W	S	G	M	L	V	G	A	L	C	A	L	A	G	V	L	T
Kv3.4	G	Y	G	D	M	Y	P	K	T	W	S	G	M	L	V	G	A	L	C	A	L	A	G	V	L	T
Kv4.1	G	Y	G	D	M	V	P	S	T	I	A	G	K	I	F	G	S	I	C	S	L	S	G	V	L	V
Kv4.2	G	Y	G	D	M	V	P	K	T	I	A	G	K	I	F	G	S	I	C	S	L	S	G	V	L	V
Kv4.3	G	Y	G	D	M	V	P	K	T	I	A	G	K	I	F	G	S	I	C	S	L	S	G	V	L	V
Kv5.1	G	Y	G	D	I	V	P	K	T	T	L	G	K	L	N	A	A	I	S	F	L	C	G	V	I	A
Kv6.1	G	Y	G	D	M	V	P	R	S	T	P	G	Q	V	V	A	L	S	S	I	L	S	G	I	L	L
Kv6.2	G	Y	G	D	M	V	P	R	S	L	P	G	Q	V	V	A	L	S	S	I	L	S	G	I	L	L
Kv6.3	G	Y	G	D	M	Y	P	I	T	V	P	G	R	I	L	G	V	C	V	V	S	G	I	V	L	
Kv6.4	G	Y	G	D	M	V	P	R	S	V	P	G	Q	M	V	A	L	S	S	I	L	S	G	I	L	I
Kv7.1	G	Y	G	D	K	V	P	Q	T	W	V	G	K	T	I	A	S	C	F	S	V	F	A	I	S	F
Kv7.2	G	Y	G	D	K	Y	P	Q	T	W	N	G	R	L	L	A	A	T	F	T	L	I	G	V	S	F
Kv7.3	G	Y	G	D	K	T	P	K	T	W	E	G	R	L	I	A	A	T	F	S	L	I	G	V	S	F
Kv7.4	G	Y	G	D	K	T	P	H	T	W	L	G	R	V	L	A	A	G	F	A	L	L	G	I	S	F
Kv7.5	G	Y	G	D	K	T	P	L	T	W	L	G	R	L	L	S	A	G	F	A	L	L	G	I	S	F
Kv8.1	G	Y	G	D	I	R	F	D	T	T	T	G	K	I	V	A	F	M	C	I	L	S	G	I	L	V
Kv8.2	G	Y	G	D	M	Y	P	E	T	H	L	G	R	F	F	A	F	L	C	I	A	F	G	I	I	L
Kv9.1	G	Y	G	D	V	V	P	V	T	V	A	G	K	L	A	A	S	G	C	I	L	G	G	I	L	V
Kv9.2	G	Y	G	D	V	V	P	Q	T	T	A	G	K	L	T	A	S	A	C	I	L	A	G	I	L	V
Kv9.3	G	Y	G	D	T	H	P	V	T	L	A	G	K	L	I	A	S	T	C	I	I	C	G	I	L	V
hERG	G	F	G	N	V	S	P	N	T	N	S	E	K	I	F	S	I	C	V	M	L	I	G	S	L	M

**Figure 1** : Comparaison des séquences protéiques des canaux Kv dans la région du pore et du segment transmembranaire S6. Les résidus dans la position homologue, de chacune des sous unités, à celle dont nous avons discuter lors de nos travaux sont en caractères gras.

La séquence de HERG exprime une leucine à la position 646. Ceci donnerait à HERG une sensibilité à la flécainide semblable à celle des sous unités Kv3.1 et Kv4.2. Effectivement, il a été démontré que le canal HERG exprimé dans des cellules HEK293 est très sensible à la flécainide ( $EC_{50} = 3.91 \pm 0.68 \mu M$ )<sup>(387)</sup>. Malgré le manque d'homologie entre HERG et d'autres canaux Kv sensible à la flécainide, la mutation de cette leucine à une isoleucine pourrait être intéressante afin d'étudier plus profondément les mécanismes de bloc de la flécainide et voir si HERG perdrait sa sensibilité à la flécainide, tel que s'est produit chez Kv3.1 et Kv4.2. La plupart des membres d'une famille, contenant un résidu d'isoleucine tester à ce jour, démontrent une certaine insensibilité à la flécainide. Par exemple, le  $EC_{50}$  de la flécainide sur Kv1.2 varie entre  $200 \mu M$ <sup>(388;389)</sup> à environ  $1 \text{ mM}$ <sup>(390)</sup>. Les données que nous introduisons dans ce travail nous mènent à concevoir d'autres expériences, notamment l'analyse systématique de ce résidu sur la variété complète des canaux Kv. Il serait intéressant de voir si la sensibilité caractéristique observé dans les sous unités exprimant une leucine se traduirait aux canaux insensibles (comme nous avons trouvé pour Kv1.5 et Kv1.4) si se résidu de leucine serait introduit. La protéine KvLQT1 (Kv7.1) contient un résidu de valine à la position d'intérêt. Ce résidu diffère des deux groupes dont nous discutons, par contre, l'étude de la sensibilité de ce canal à la flécainide pourrait être intéressante puisque elle montrerait l'effet d'un résidu autre que l'isoleucine ou la leucine à la position d'intérêt. D'une autre part, l'introduction d'une leucine/isoleucine en place de sa valine expliquerait les effets de ces résidus, et pourrait démontrer plus clairement si la présence de l'isoleucine/leucine introduit une prédictibilité de la sensibilité à la flécainide.

L'étude de la structure fonction d'un canal ou de l'interaction d'une molécule avec un canal ne peut être étudié en se basant sur un seul résidu en isolation. Le

complexe est situé dans un milieu restreint et dans des conditions dynamiques (eg : ouverture et fermeture du canal) incluant toutes les configurations que peuvent prendre les canaux. Il est fort probable que la flécainide interagisse avec d'autres résidus dans la voie de conduction du canal. La mutation des résidus dans cette région du canal tels que la thréonine et la méthionine à la base du pore, qui ont été décrits comme site d'interaction pour d'autres agents ayant effet sur les canaux dans leur configuration ouverte. De plus le « scanning » à l'alanine de la région incluant le pore et les segments S5 et S6 pourrait clarifier le rôle de chacun des résidus dans cette région du point de vue sensibilité pharmacologique.

Une idée ressortant de plusieurs études stipule que les résidus localisés dans le pore et le segment S6 forment les sites d'interaction pour les peptides et les agents bloquant le pore des canaux potassiques dépendants du voltage en configuration ouverte. Il est important de noter, par contre, que pas tous les bloqueurs d'un certain canal ne se lient aux mêmes sites récepteurs. Il a été décrit que le bloc de HERG par la MK-499 est très affecté par une mutation à la valine-625, tandis que le bloc par la cisapride ni la terfenadine ne fut affecté. Donc, même si ces agents interagissent tous avec la tyrosine-652 et la phénylalanine-656, ils diffèrent dans leurs interactions avec des résidus situés plus près du filtre de sélectivité.

D'autres études seraient nécessaires pour déterminer si des agents autres que la flécainide interagissent avec le résidu du segment S6. De plus il serait intéressant d'étudier l'effet de l'introduction d'autres résidus telle que la valine sur la sensibilité de ces canaux, puisque la valine ressemble plus à la leucine qu'à l'isoleucine.

Le modèle que nous rapportons en Figure 8 de la deuxième partie nous permet de spéculer sur les différents résidus avec lesquels la molécule de flécainide pourrait

interagir dans le canal. Par contre ceci n'est qu'une approximation. Souvent, les données de la configuration structurale d'une protéine et d'une drogue sont disponibles mais rarement dans la même étude. Des études récentes ont construit un modèle basé sur l'homologie des canaux potassiques bactériens et y introduire la molécule pharmacologique<sup>(377)</sup>. En suite ils ont pu minimiser les énergies d'interactions en introduisant des paramètres de restriction dans leur modèle digital. L'usage de cette méthode pourrait être intéressante dans notre modèle afin de pouvoir mieux expliquer l'interaction de la flécainide et le canal. Par contre il faudrait, en premier lieu, modéliser la molécule de flécainide. Une fois la drogue modélisée, l'étude systématique à l'aide de la mutagenèse dirigée et la modélisation des interactions drogue-canal nous permettra de mieux comprendre ces interactions et de synthétiser des molécules encore plus efficaces ayant moins d'effet secondaires.

#### 4 Conclusion

La différence de la sensibilité à la flécainide entre Kv1.4 et Kv4.2 est généralement reconnue. Par conséquent la flécainide a été utilisée comme outil d'exploration des bases moléculaires du courant  $I_{to}$  endogène<sup>(109;391)</sup>. Des différences de sensibilité à la flécainide, ont également été notées entre les courants  $I_{Kur}$  humain (Kv1.5)<sup>(199)</sup> et canin (Kv3.1)<sup>(392)</sup>. Nos expériences ont démontré qu'il existe une base moléculaire commune déterminant les différences de sensibilité des canaux Kv.

La fibrillation auriculaire est l'arythmie clinique la plus courante et son traitement laisse, encore, à désirer<sup>(393)</sup>. Due à sa localisation exclusive à l'oreillette, le canal  $I_{Kur}$

humain est tenu comme une cible viable pour le développement de nouveaux agents antiarythmiques<sup>(116)</sup>. Une connaissance plus approfondie des déterminants moléculaires de la sensibilité aux drogues de Kv1.5 et d'autres canaux pourrait aider au développement rationnel de nouveaux composés efficaces.

# **SOURCES DOCUMENTAIRES**

1. Powell T, Twist VW. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;72:327-333.
2. Hamill OP, Marty A, Neher E et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981;391:85-100.
3. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260:799-802.
4. Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium *J Physiol.* 2000;525 Pt 2:285-298.
5. Fozzard HA. Cardiac electrogenesis and the sodium channel. In: Spooner PM, Brown AM, Catterall WA, Kaczorowski GJ, Strauss HC, editors. Ion channels in the cardiovascular system. Function and dysfunction. New York: Future Publishing Company, Inc., 1993: 81-100.
6. Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol.* 1981;318:479-500.
7. Follmer CH, Ten Eick RE, Yeh JZ. Sodium current kinetics in cat atrial myocytes. *J Physiol.* 1987;384:169-197.
8. Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T et al. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ Res.* 1992;71:535-546.
9. Makielski JC, Sheets MF, Hanck DA et al. Sodium current in voltage clamped internally perfused canine cardiac Purkinje cells. *Biophys J.* 1987;52:1-11.
10. Benndorf K, Boldt W, Nilius B. Sodium current in single myocardial mouse cells. *Pflugers Arch.* 1985;404:190-196.
11. Hanck DA. Biophysics of cardiac sodium channels. In: Zipes DP, Jalife JJ, editors. Cardiac electrophysiology: From cell to bedside. New York: W.B. Saunders Co., 1995: 65-73.
12. Roden DM, George AL, Jr. Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol.* 1997;273:H511-H525.
13. Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ et al. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:554-558.

14. Nattel S, Kneller J, Zou R et al. Mechanisms of termination of atrial fibrillation by Class I antiarrhythmic drugs: evidence from clinical, experimental, and mathematical modeling studies. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:S133-S139.
15. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N Engl J Med*. 1989;321:406-412.
16. Ruskin JN. The cardiac arrhythmia suppression trial (CAST). *N Engl J Med*. 1989;321:386-388.
17. Nattel S. Experimental evidence for proarrhythmic mechanisms of antiarrhythmic drugs. *Cardiovasc Res*. 1998;37:567-577.
18. Yong SL, Xu R, McLarnon JG et al. RSD1000: a novel antiarrhythmic agent with increased potency under acidic and high-potassium conditions. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289:236-244.
19. Ten Eick RE, Whalley DW, Rasmussen HH. Connections: heart disease, cellular electrophysiology, and ion channels. *FASEB J*. 1992;6:2568-2580.
20. McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W et al. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 1994;74:365-507.
21. Nilius B, Hess P, Lansman JB et al. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*. 1985;316:443-446.
22. Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol*. 1997;272:H597-H605.
23. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1985;86:1-30.
24. Wu JY, Lipsius SL. Effects of extracellular  $Mg^{2+}$  on T- and L-type  $Ca^{2+}$  currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol*. 1990;259:H1842-H1850.
25. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1988;395:233-253.
26. Hirano Y, Fozzard HA, January CT. Characteristics of L- and T-type  $Ca^{2+}$  currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol*. 1989;256:H1478-H1492.
27. Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:5340-5344.



28. Zhou Z, January CT. Both T- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells. *Biophys J*. 1998;74:1830-1839.
29. Sipido KR, Carmeliet E, Van de WF. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current as a trigger for  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1998;508 ( Pt 2):439-451.
30. Kawano S, DeHaan RL. Developmental changes in the calcium currents in embryonic chick ventricular myocytes. *J Membr Biol*. 1991;120:17-28.
31. Hess P. Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review. *Can J Physiol Pharmacol*. 1988;66:1218-1223.
32. Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol*. 1984;84:705-726.
33. Mentrard D, Vassort G, Fischmeister R. Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in cesium-loaded frog heart cells. *J Gen Physiol*. 1984;83:105-131.
34. Kass RS, Scheuer T. Slow inactivation of calcium channels in the cardiac Purkinje fiber. *J Mol Cell Cardiol*. 1982;14:615-618.
35. Campbell DL, Giles WR, Hume JR et al. Inactivation of calcium current in bull-frog atrial myocytes. *J Physiol*. 1988;403:287-315.
36. Tseng GN, Robinson RB, Hoffman BF. Passive properties and membrane currents of canine ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1987;90:671-701.
37. Irisawa H. Electrophysiology of single cardiac cells. *Jpn J Physiol*. 1984;34:375-388.
38. Isenberg G, Klockner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Arch*. 1982;395:30-41.
39. Brehm P, Eckert R, Tillotson D. Calcium-mediated inactivation of calcium current in Paramecium. *J Physiol*. 1980;306:193-203.
40. Sun H, Leblanc N, Nattel S. Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes. *Am J Physiol*. 1997;272:H1625-H1635.
41. de Leon M, Wang Y, Jones L et al. Essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif for  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Science*. 1995;270:1502-1506.
42. Noma A, Irisawa H. A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch*. 1976;366:251-258.

43. DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol*. 1981;314:359-376.
44. Callewaert G, Carmeliet E, Vereecke J. Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J Physiol*. 1984;349:643-661.
45. Noma A, Irisawa H, Kokobun S et al. Slow current systems in the A-V node of the rabbit heart. *Nature*. 1980;285:228-229.
46. Thuringer D, Lauribe P, Escande D. A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24:451-455.
47. Cerbai E, Pino R, Porciatti F et al. Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation*. 1997;95:568-571.
48. Altomare C, Terragni B, Brioschi C et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol*. 2003;549:347-359.
49. Baker K, Warren KS, Yellen G et al. Defective "pacemaker" current (I<sub>h</sub>) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4554-4559.
50. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:455-472.
51. Santoro B, Grant SG, Bartsch D et al. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14815-14820.
52. Santoro B, Tibbs GR. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:741-764.
53. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. 1998;393:587-591.
54. Ludwig A, Zong X, Stieber J et al. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J*. 1999;18:2323-2329.
55. Moroni A, Gorza L, Beltrame M et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem*. 2001;276:29233-29241.
56. Vaccari T, Moroni A, Rocchi M et al. The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1446:419-425.

57. Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem.* 2001;276:6069-6072.
58. Surawicz B. Role of potassium channels in cycle length dependent regulation of action potential duration in mammalian cardiac Purkinje and ventricular muscle fibres. *Cardiovasc Res.* 1992;26:1021-1029.
59. Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac Ultrarapid Delayed Rectifiers. a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9:217-226.
60. Oudit GY, Kassiri Z, Sah R et al. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:851-872.
61. Giles WR, van Ginneken AC. A transient outward current in isolated cells from the crista terminalis of rabbit heart. *J Physiol.* 1985;368:243-264.
62. Nakayama T, Irisawa H. Transient outward current carried by potassium and sodium in quiescent atrioventricular node cells of rabbits. *Circ Res.* 1985;57:65-73.
63. Tseng GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res.* 1989;64:633-647.
64. Zygmunt AC. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1994;267:H1984-H1995.
65. Zygmunt AC, Gibbons WR. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1991;68:424-437.
66. Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N et al. Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res.* 1990;67:1287-1291.
67. Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res.* 1988;62:116-126.
68. Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1999;113:661-678.
69. Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1991;97:973-1011.
70. Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R et al. Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *Am J Physiol.* 1999;276:H1599-H1607.

71. Amos GJ, Wettwer E, Metzger F et al. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol.* 1996;491 ( Pt 1):31-50.
72. Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P et al. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation.* 1996;93:168-177.
73. Nabauer M. Electrical heterogeneity in the ventricular wall--and the M cell. *Cardiovasc Res.* 1998;40:248-250.
74. Wettwer E, Amos G, Gath J et al. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1662-1669.
75. Yue L, Feng J, Li GR et al. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol.* 1996;270:H2157-H2168.
76. Boyle WA, Nerbonne JM. A novel type of depolarization-activated  $K^+$  current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am J Physiol.* 1991;260:H1236-H1247.
77. Boyle WA, Nerbonne JM. Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward  $K^+$  currents in rat atrial myocytes. *J Gen Physiol.* 1992;100:1041-1067.
78. Bou-Abboud E, Li H, Nerbonne JM. Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated  $K^+$  currents in mouse atrial cells. *J Physiol.* 2000;529 Pt 2:345-358.
79. Xu H, Li H, Nerbonne JM. Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit. *J Physiol.* 1999;519 Pt 1:11-21.
80. Fermini B, Wang Z, Duan D et al. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol.* 1992;263:H1747-H1754.
81. Escande D, Coulombe A, Faivre JF et al. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol.* 1987;252:H142-H148.
82. Shibata EF, Drury T, Refsum H et al. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol.* 1989;257:H1773-H1781.
83. Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol.* 1988;405:123-145.
84. Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol.* 1989;410:187-212.

85. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH et al. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*. 1991;69:1427-1449.
86. Li GR, Feng J, Yue L et al. Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol*. 1998;275:H369-H377.
87. Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C. Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res*. 1993;72:671-687.
88. Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res*. 1996;78:262-273.
89. Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998;37:324-334.
90. Bond CT, Pessia M, Xia XM et al. Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels*. 1994;2:183-191.
91. Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand*. 1993;149:133-142.
92. Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol*. 1996;271:H548-H561.
93. Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E et al. Repolarizing K<sup>+</sup> currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation*. 1999;99:206-210.
94. Nabauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*. 1993;73:386-394.
95. Antzelevitch C, Sicouri S, Lukas A et al. Regional differences in the electrophysiology of ventricular cells: physiological and clinical implications. In: Zipes DP, Jalife JJ, editors. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995: 228-245.
96. Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL et al. Distinct transient outward potassium current (Ito) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1999;113:581-600.

97. Wang Z, Feng J, Shi H et al. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward  $K^+$  current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res*. 1999;84:551-561.
98. Wickenden AD, Lee P, Sah R et al. Targeted expression of a dominant-negative  $K(v)4.2 K^+$  channel subunit in the mouse heart. *Circ Res*. 1999;85:1067-1076.
99. Wickenden AD, Tsushima RG, Losito VA et al. Effect of  $Cd^{2+}$  on  $Kv4.2$  and  $Kv1.4$  expressed in *Xenopus* oocytes and on the transient outward currents in rat and rabbit ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem*. 1999;9:11-28.
100. Clark RB, Giles WR, Imaizumi Y. Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol*. 1988;405:147-168.
101. Kaab S, Dixon J, Duc J et al. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in  $Kv4.3$  mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*. 1998;98:1383-1393.
102. Dixon JE, Shi W, Wang HS et al. Role of the  $Kv4.3 K^+$  channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*. 1996;79:659-668.
103. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J et al. Molecular diversity of  $K^+$  channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:233-285.
104. Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;42:270-283.
105. An WF, Bowlby MR, Betty M et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 2000;403:553-556.
106. Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac  $K^+$  channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol*. 2003;194:141-152.
107. Rosati B, Pan Z, Lypen S et al. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol*. 2001;533:119-125.
108. Goldman-Wohl DS, Chan E, Baird D et al.  $Kv3.3b$ : a novel Shaw type potassium channel expressed in terminally differentiated cerebellar Purkinje cells and deep cerebellar nuclei. *J Neurosci*. 1994;14:511-522.
109. Han W, Wang Z, Nattel S. A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H466-H474.
110. Han W, Bao W, Wang Z et al. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*. 2002;91:790-797.

111. Rettig J, Wunder F, Stocker M et al. Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *EMBO J*. 1992;11:2473-2486.
112. Schroter KH, Ruppersberg JP, Wunder F et al. Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett*. 1991;278:211-216.
113. Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y et al. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol*. 1993;101:571-601.
114. Carmeliet E, Biermans G, Callewaert G et al. Potassium currents in cardiac cells. *Experientia*. 1987;43:1175-1184.
115. Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res*. 1984;54:157-162.
116. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circulation Research*. 1993;73:1061-1076.
117. Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J Physiol*. 1990;423:257-277.
118. Campbell DL, Rasmusson RL, Comer MB et al. The cardiac calcium-independent transient outward potassium current: kinetics molecular properties, and roles in ventricular repolarization. In: Zipes DP, Jalife JJ, editors. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995: 83-96.
119. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:517-527.
120. Noble D, Tsien RW. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*. 1969;200:205-231.
121. Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Gating of delayed rectification in acutely isolated canine cardiac Purkinje myocytes. Evidence for a single voltage-gated conductance. *Biophys J*. 1985;48:1059-1064.
122. Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub>) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I<sub>Ks</sub> contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res*. 1995;76:351-365.
123. Yue L, Feng J, Li GR et al. Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol (Lond)*. 1996;496 ( Pt 3):647-662.

124. Furukawa T, Kimura S, Furukawa N et al. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res.* 1992;70:91-103.
125. Carmeliet E. Electrophysiologic and voltage clamp analysis of the effects of sotalol on isolated cardiac muscle and Purkinje fibers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;232:817-825.
126. Shibasaki T. Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol.* 1987;387:227-250.
127. Veldkamp MW, van Ginneken AC, Bouman LN. Single delayed rectifier channels in the membrane of rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1993;72:865-878.
128. Fiset C, Clark RB, Larsen TS et al. A rapidly activating sustained  $K^+$  current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond).* 1997;504 ( Pt 3):557-563.
129. Guo W, Xu H, London B et al. Molecular basis of transient outward  $K^+$  current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 1999;521 Pt 3:587-599.
130. London B, Jeron A, Zhou J et al. Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2926-2931.
131. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of  $K^+$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res.* 1993;73:379-385.
132. Li GR, Feng J, Yue L et al. Evidence for two components of delayed rectifier  $K^+$  current in human ventricular myocytes. *Circulation Research.* 1996;78:689-696.
133. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Mechanism of flecainide's rate-dependent actions on action potential duration in canine atrial tissue. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267:575-581.
134. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovascular Research.* 1994;28:1540-1546.
135. Brown HF. Electrophysiology of the sinoatrial node. *Physiol Rev.* 1982;62:505-530.
136. Hauswirth O, Noble D, Tsien RW. The mechanism of oscillatory activity at low membrane potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol.* 1969;200:255-265.
137. Irisawa H. Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. *Physiol Rev.* 1978;58:461-498.
138. Ito H, Ono K. A rapidly activating delayed rectifier  $K^+$  channel in rabbit sinoatrial node cells. *Am J Physiol.* 1995;269:H443-H452.



139. Ono K, Ito H. Role of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current in sinoatrial node pacemaker activity. *Am J Physiol*. 1995;269:H453-H462.
140. Verheijck EE, van Ginneken AC, Bourrier J et al. Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circ Res*. 1995;76:607-615.
141. Roden DM, Lazzara R, Rosen M et al. Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*. 1996;94:1996-2012.
142. McAllister RE, Noble D, Tsien RW. Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*. 1975;251:1-59.
143. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*. 1990;96:195-215.
144. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol*. 1991;260:H393-H399.
145. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*. 1996;379:833-836.
146. Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem*. 1999;9:201-216.
147. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME et al. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. 1995;81:299-307.
148. Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:27-35.
149. Tseng GN. I(Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:835-849.
150. Abbott GW, Sesti F, Splawski I et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97:175-187.
151. Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res*. 1995;77:1246-1253.
152. Varro A, Lathrop DA, Hester SB et al. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol*. 1993;88:93-102.

153. Zeng J, Laurita KR, Rosenbaum DS et al. Two components of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes of the guinea pig type. Theoretical formulation and their role in repolarization. *Circ Res*. 1995;77:140-152.
154. Laurita KR, Girouard SD, Rosenbaum DS. Modulation of ventricular repolarization by a premature stimulus. Role of epicardial dispersion of repolarization kinetics demonstrated by optical mapping of the intact guinea pig heart. *Circ Res*. 1996;79:493-503.
155. Volders PG, Sipido KR, Vos MA et al. Downregulation of delayed rectifier K<sup>(+)</sup> currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation*. 1999;100:2455-2461.
156. Weerapura M, Hebert TE, Nattel S. Dofetilide block involves interactions with open and inactivated states of HERG channels. *Pflugers Arch*. 2002;443:520-531.
157. Kiehn J, Lacerda AE, Wible B et al. Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation*. 1996;94:2572-2579.
158. Spector PS, Curran ME, Keating MT et al. Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res*. 1996;78:499-503.
159. Mitcheson JS, Chen J, Sanguinetti MC. Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol*. 2000;115:229-240.
160. Roden DM, Balser JR. A plethora of mechanisms in the HERG-related long QT syndrome. Genetics meets electrophysiology. *Cardiovasc Res*. 1999;44:242-246.
161. Mitcheson JS, Chen J, Lin M et al. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12329-12333.
162. Dessertenne F. [Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1966;59:263-272.
163. Gintant GA. Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does IKs play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circ Res*. 1996;78:26-37.
164. Hondeghem LM, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation*. 1990;81:686-690.
165. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res*. 1993;72:75-83.

166. Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *Am J Cardiol.* 1999;84:20R-28R.
167. Nattel S, Zeng FD. Frequency-dependent effects of antiarrhythmic drugs on action potential duration and refractoriness of canine cardiac Purkinje fibers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;229:283-291.
168. Wang J, Bourne GW, Wang Z et al. Comparative mechanisms of antiarrhythmic drug action in experimental atrial fibrillation. Importance of use-dependent effects on refractoriness. *Circulation.* 1993;88:1030-1044.
169. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E et al. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature.* 1996;384:78-80.
170. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature.* 1996;384:80-83.
171. Nakashima H, Gerlach U, Schmidt D et al. In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovasc Res.* 2004;61:705-714.
172. Han W, Wang Z, Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1075-H1080.
173. Varro A, Balati B, Iost N et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol.* 2000;523 Pt 1:67-81.
174. Bosch RF, Gaspo R, Busch AE et al. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;38:441-450.
175. Lu Z, Kamiya K, Opthof T et al. Density and kinetics of I(Kr) and I(Ks) in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I(Ks) blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation.* 2001;104:951-956.
176. Stump GL, Smith GR, Tebben AJ et al. In vivo canine cardiac electrophysiologic profile of 1,4-benzodiazepine IKs blockers. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:105-112.
177. Banyasz T, Koncz R, Fulop L et al. Profile of I(Ks) during the action potential questions the therapeutic value of I(Ks) blockade. *Curr Med Chem.* 2004;11:45-60.
178. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science.* 2003;299:251-254.

179. Salata JJ, Selnickb HG, Lynch JJ, Jr. Pharmacological modulation of I(Ks): potential for antiarrhythmic therapy. *Curr Med Chem.* 2004;11:29-44.
180. Busch AE, Eigenberger B, Jurkiewicz NK et al. Blockade of HERG channels by the class III antiarrhythmic azimilide: mode of action. *Br J Pharmacol.* 1998;123:23-30.
181. Nattel S, Liu L, St Georges D. Effects of the novel antiarrhythmic agent azimilide on experimental atrial fibrillation and atrial electrophysiologic properties. *Cardiovasc Res.* 1998;37:627-635.
182. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  in gating of cardiac delayed rectifier  $K^{+}$  currents. *Pflugers Arch.* 1992;420:180-186.
183. Scamps F, Carmeliet E. Effect of external  $K^{+}$  on the delayed  $K^{+}$  current in single rabbit Purkinje cells. *Pflugers Arch.* 1989;414 Suppl 1:S169-S170.
184. Balsler JR, Bennett PB, Roden DM. Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier. *J Gen Physiol.* 1990;96:835-863.
185. Horie M, Hayashi S, Kawai C. Two types of delayed rectifying  $K^{+}$  channels in atrial cells of guinea pig heart. *Jpn J Physiol.* 1990;40:479-490.
186. Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol.* 1998;112:651-663.
187. Veldkamp MW, van Ginneken AC, Opthof T et al. Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation.* 1995;92:3497-3504.
188. Anumonwo JM, Freeman LC, Kwok WM et al. Delayed rectification in single cells isolated from guinea pig sinoatrial node. *Am J Physiol.* 1992;262:H921-H925.
189. Follmer CH, Colatsky TJ. Block of delayed rectifier potassium current, IK, by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. *Circulation.* 1990;82:289-293.
190. Freeman LC, Kass RS. Delayed rectifier potassium channels in ventricle and sinoatrial node of the guinea pig: molecular and regulatory properties. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1993;7 Suppl 3:627-635.
191. Feng J, Wible B, Li GR et al. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier  $K^{+}$  current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res.* 1997;80:572-579.
192. Fedida D, Eldstrom J, Hesketh JC et al. Kv1.5 is an important component of repolarizing  $K^{+}$  current in canine atrial myocytes. *Circulation Research.* 2003;93:744-751.

193. Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel alpha/beta subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9:253-258.
194. Yue DT, Marban E. A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflugers Arch*. 1988;413:127-133.
195. Feng J, Xu D, Wang Z et al. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am J Physiol*. 1998;275:H1717-H1725.
196. Feng J, Wang Z, Li GR et al. Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:384-392.
197. Seki A, Hagiwara N, Kasanuki H. Effects of propafenone on K currents in human atrial myocytes. *Br J Pharmacol*. 1999;126:1153-1162.
198. Tamargo J, Caballero R, Gomez R et al. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 2004;62:9-33.
199. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272:184-196.
200. Knobloch K, Brendel J, Peukert S et al. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur) channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002;366:482-487.
201. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol*. 1998;275:H301-H321.
202. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res*. 1999;42:477-489.
203. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN et al. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 1993;362:127-133.
204. Wible BA, De Biasi M, Majumder K et al. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res*. 1995;76:343-350.
205. Wang Z, Yue L, White M et al. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation*. 1998;98:2422-2428.

206. Ashen MD, O'Rourke B, Kluge KA et al. Inward rectifier K<sup>+</sup> channel from human heart and brain: cloning and stable expression in a human cell line. *Am J Physiol.* 1995;268:H506-H511.
207. Ishii K, Yamagishi T, Taira N. Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* 1994;338:107-111.
208. Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport.* 1994;5:2501-2505.
209. Topert C, Doring F, Wischmeyer E et al. Kir2.4: a novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci.* 1998;18:4096-4105.
210. Wood LS, Tsai TD, Lee KS et al. Cloning and functional expression of a human gene, hIRK1, encoding the heart inward rectifier K<sup>+</sup>-channel. *Gene.* 1995;163:313-317.
211. Josephson IR, Sperelakis N. Developmental increases in the inwardly-rectifying K<sup>+</sup> current of embryonic chick ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1052:123-127.
212. Wahler GM. Developmental increases in the inwardly rectifying potassium current of rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1992;262:C1266-C1272.
213. Nakamura TY, Artman M, Rudy B et al. Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol.* 1998;274:H892-H900.
214. Sanguinetti MC, Salata JJ. Cardiac potassium channel modulators: potential for antiarrhythmic therapy. In: Evans J, Hamilton T, Longman S, Stemp G, editors. Potassium channels and their modulators. From synthesis to clinical experience. London: Taylor & Francis, 1996: 221-256.
215. Kurachi Y. G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel. *Am J Physiol.* 1995;269:C821-C830.
216. Okabe K, Yatani A, Brown AM. The nature and origin of spontaneous noise in G protein-gated ion channels. *J Gen Physiol.* 1991;97:1279-1293.
217. Kaibara M, Nakajima T, Irisawa H et al. Regulation of spontaneous opening of muscarinic K<sup>+</sup> channels in rabbit atrium. *J Physiol.* 1991;433:589-613.
218. Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature.* 1983;303:250-253.

219. Garber SS, Hoshi T, Aldrich RW. Interaction of forskolin with voltage-gated K<sup>+</sup> channels in PC12 cells. *J Neurosci*. 1990;10:3361-3368.
220. Heidbuchel H, Vereecke J, Carmeliet E. Three different potassium channels in human atrium. Contribution to the basal potassium conductance. *Circ Res*. 1990;66:1277-1286.
221. Sorota S, Hoffman BF. Role of G proteins in the acetylcholine-induced potassium current of canine atrial cells. *Am J Physiol*. 1989;257:H1516-H1522.
222. Koumi S, Wasserstrom JA. Acetylcholine-sensitive muscarinic K<sup>+</sup> channels in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1994;266:H1812-H1821.
223. Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF et al. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10235-10239.
224. Corey S, Krapivinsky G, Krapivinsky L et al. Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH. *J Biol Chem*. 1998;273:5271-5278.
225. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983;305:147-148.
226. Findlay I. The ATP sensitive potassium channel of cardiac muscle and action potential shortening during metabolic stress. *Cardiovasc Res*. 1994;28:760-761.
227. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81:133-176.
228. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;274:C25-C37.
229. Monsuez JJ. Cardiac potassium currents and channels--part I: basic science aspects. *Int J Cardiol*. 1997;61:209-219.
230. Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ. ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res*. 1991;68:280-287.
231. Grover GJ. Protective effects of ATP sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1994;28:778-782.
232. Yao Z, Gross GJ. Activation of ATP-sensitive potassium channels lowers threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*. 1994;267:H1888-H1894.
233. Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*. 1987;387:251-272.

234. Kakei M, Noma A, Shibasaki T. Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*. 1985;363:441-462.
235. Trube G, Hescheler J. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Arch*. 1984;401:178-184.
236. Findlay I. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat ventricular myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations. *Pflugers Arch*. 1987;410:313-320.
237. Nichols CG, Lederer WJ. The mechanism of KATP channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol*. 1991;97:1095-1098.
238. Standen NB, Quayle JM, Davies NW et al. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*. 1989;245:177-180.
239. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C et al. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*. 1997;387:179-183.
240. Inagaki N, Gono T, Clement JP et al. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*. 1995;270:1166-1170.
241. Suzuki M, Li RA, Miki T et al. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res*. 2001;88:570-577.
242. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117:500-544.
243. Kallen RG, Cohen SA, Barchi RL. Structure, function and expression of voltage-dependent sodium channels. *Mol Neurobiol*. 1993;7:383-428.
244. George AL, Jr., Varkony TA, Drabkin HA et al. Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;68:67-70.
245. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;28:365-368.
246. Chandy KG, Gutman GA. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci*. 1993;14:434.
247. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 2000;25:533-535.
248. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev*. 2003;55:575-578.



249. Stuhmer W, Conti F, Suzuki H et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*. 1989;339:597-603.
250. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. First Edition ed. Sunderland, MA: 1984.
251. Noda M, Suzuki H, Numa S et al. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett*. 1989;259:213-216.
252. Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W et al. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett*. 1991;293:93-96.
253. Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W et al. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*. 1992;356:441-443.
254. Backx PH, Yue DT, Lawrence JH et al. Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. *Science*. 1992;257:248-251.
255. Heinemann SH, Terlau H, Imoto K. Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Pflugers Arch*. 1992;422:90-92.
256. Satin J, Kyle JW, Chen M et al. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*. 1992;256:1202-1205.
257. Bennett PB, Jr., Makita N, George AL, Jr. A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett*. 1993;326:21-24.
258. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE et al. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. 1992;256:839-842.
259. Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS et al. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. 1995;83:433-442.
260. Schreibmayer W, Wallner M, Lotan I. Mechanism of modulation of single sodium channels from skeletal muscle by the beta 1-subunit from rat brain. *Pflugers Arch*. 1994;426:360-362.
261. Chen C, Cannon SC. Modulation of Na<sup>+</sup> channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflugers Arch*. 1995;431:186-195.
262. Makita N, Bennett PB, George AL, Jr. Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci*. 1996;16:7117-7127.

263. McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D et al. Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem.* 1998;273:3954-3962.
264. Qu Y, Rogers JC, Chen SF et al. Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta1 subunits. *J Biol Chem.* 1999;274:32647-32654.
265. Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:15753-15757.
266. Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD et al. Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem.* 1999;274:26511-26517.
267. Makita N, Bennett PB, Jr., George AL, Jr. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem.* 1994;269:7571-7578.
268. Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE et al. Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J Biol Chem.* 1995;270:25696-25701.
269. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-555.
270. Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP et al. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2003;55:579-581.
271. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry.* 1984;23:2113-2118.
272. Curtis BM, Catterall WA. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:2528-2532.
273. Hosey MM, Barhanin J, Schmid A et al. Photoaffinity labelling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylalkylamine-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;147:1137-1145.
274. Leung AT, Imagawa T, Campbell KP. Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem.* 1987;262:7943-7946.

275. Striessnig J, Knaus HG, Grabner M et al. Photoaffinity labelling of the phenylalkylamine receptor of the skeletal muscle transverse-tubule calcium channel. *FEBS Lett.* 1987;212:247-253.
276. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF et al. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:5478-5482.
277. Ellis SB, Williams ME, Ways NR et al. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science.* 1988;241:1661-1664.
278. Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. Dual function of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron.* 1996;16:431-440.
279. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:399-418.
280. Hui A, Ellinor PT, Krizanova O et al. Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron.* 1991;7:35-44.
281. Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP et al. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron.* 1991;7:45-57.
282. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998;19:260-263.
283. Williams ME, Feldman DH, McCue AF et al. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron.* 1992;8:71-84.
284. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 1998;391:896-900.
285. Striessnig J. Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca<sup>(2+)</sup> channels. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9:242-269.
286. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;139:33-87.
287. Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson BD et al. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:361-396.

288. Heady TN, Gomora JC, Macdonald TL et al. Molecular pharmacology of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Jpn J Pharmacol*. 2001;85:339-350.
289. Safayhi H, Haase H, Kramer U et al. L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol*. 1997;11:619-629.
290. Takimoto K, Li D, Nerbonne JM et al. Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac alpha 1C and alpha 1D voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel mRNAs. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:3035-3042.
291. Pichler M, Cassidy TN, Reimer D et al. Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem*. 1997;272:13877-13882.
292. Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*. 1987;50:405-413.
293. Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL et al. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science*. 1987;237:749-753.
294. Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL et al. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila. *Science*. 1987;237:770-775.
295. Butler A, Wei AG, Baker K et al. A family of putative potassium channel genes in Drosophila. *Science*. 1989;243:943-947.
296. Butler A, Wei A, Salkoff L. Shal, Shab, and Shaw: three genes encoding potassium channels in Drosophila. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:2173-2174.
297. Castellano A, Chiara MD, Mellstrom B et al. Identification and functional characterization of a  $\text{K}^+$  channel alpha-subunit with regulatory properties specific to brain. *J Neurosci*. 1997;17:4652-4661.
298. Drewe JA, Verma S, Frech G et al. Distinct spatial and temporal expression patterns of  $\text{K}^+$  channel mRNAs from different subfamilies. *J Neurosci*. 1992;12:538-548.
299. Hugnot JP, Salinas M, Lesage F et al. Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO J*. 1996;15:3322-3331.
300. Salinas M, Duprat F, Heurteaux C et al. New modulatory alpha subunits for mammalian Shab  $\text{K}^+$  channels. *J Biol Chem*. 1997;272:24371-24379.
301. Zhao B, Rassendren F, Kaang BK et al. A new class of noninactivating  $\text{K}^+$  channels from aplysia capable of contributing to the resting potential and firing patterns of neurons. *Neuron*. 1994;13:1205-1213.

302. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 1993;362:31-38.
303. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:171-191.
304. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*. 1991;350:232-235.
305. Li M, Jan YN, Jan LY. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*. 1992;257:1225-1230.
306. Shen NV, Chen X, Boyer MM et al. Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly. *Neuron*. 1993;11:67-76.
307. Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. *Neuron*. 1995;14:625-633.
308. Kurz LL, Zuhlke RD, Zhang HJ et al. Side-chain accessibilities in the pore of a K<sup>+</sup> channel probed by sulfhydryl-specific reagents after cysteine-scanning mutagenesis. *Biophys J*. 1995;68:900-905.
309. Lu Q, Miller C. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science*. 1995;268:304-307.
310. Pascual JM, Shieh CC, Kirsch GE et al. K<sup>+</sup> pore structure revealed by reporter cysteines at inner and outer surfaces. *Neuron*. 1995;14:1055-1063.
311. Goldstein SA. A structural vignette common to voltage sensors and conduction pores: canaliculi. *Neuron*. 1996;16:717-722.
312. England SK, Uebele VN, Shear H et al. Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6309-6313.
313. Majumder K, De Biasi M, Wang Z et al. Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Lett*. 1995;361:13-16.
314. Morales MJ, Castellino RC, Crews AL et al. A novel beta subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel alpha subunits. *J Biol Chem*. 1995;270:6272-6277.
315. Rettig J, Heinemann SH, Wunder F et al. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*. 1994;369:289-294.

316. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. 1990;250:533-538.
317. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*. 1990;250:568-571.
318. Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature*. 1991;353:86-90.
319. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 1991;7:547-556.
320. Yellen G, Sodickson D, Chen TY et al. An engineered cysteine in the external mouth of a K<sup>+</sup> channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J*. 1994;66:1068-1075.
321. Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5092-5095.
322. Lopez GA, Jan YN, Jan LY. Hydrophobic substitution mutations in the S4 sequence alter voltage-dependent gating in Shaker K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. 1991;7:327-336.
323. Papazian DM, Timpe LC, Jan YN et al. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. 1991;349:305-310.
324. Treptow W, Maigret B, Chipot C et al. Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: a model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel. *Biophys J*. 2004;87:2365-2379.
325. Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA et al. Exchange of conduction pathways between two related K<sup>+</sup> channels. *Science*. 1991;251:942-944.
326. Lopez GA, Jan YN, Jan LY. Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature*. 1994;367:179-182.
327. Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels. *Neuron*. 1993;11:739-749.
328. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T et al. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J*. 1994;66:1061-1067.
329. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998;280:69-77.
330. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett*. 2003;555:62-65.

331. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal  $Mg^{2+}$ . *Nature*. 1987;325:156-159.
332. Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2560-2564.
333. Ficker E, Taglialatela M, Wible BA et al. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier  $K^+$  channels. *Science*. 1994;266:1068-1072.
334. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 1994;372:366-369.
335. Taglialatela M, Wible BA, Caporaso R et al. Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying  $K^+$  channels. *Science*. 1994;264:844-847.
336. Stanfield PR, Davies NW, Shelton PA et al. The intrinsic gating of inward rectifier  $K^+$  channels expressed from the murine IRK1 gene depends on voltage,  $K^+$  and  $Mg^{2+}$ . *J Physiol*. 1994;475:1-7.
337. Yang J, Jan YN, Jan LY. Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier  $K^+$  channel. *Neuron*. 1995;14:1047-1054.
338. Nattel S, Quantz MA. Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc Res*. 1988;22:808-817.
339. Sicouri S, Antzelevitch C. Electrophysiologic characteristics of M cells in the canine left ventricular free wall. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995;6:591-603.
340. Han W, Chartier D, Li D et al. Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation*. 2001;104:2095-2100.
341. Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1989;256:H1450-H1461.
342. Li D, Melnyk P, Feng J et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation*. 2000;101:2631-2638.
343. Yue L, Melnyk P, Gaspo R et al. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;84:776-784.
344. De Ferrari GM, Viola MC, D'Amato E et al. Distinct patterns of calcium transients during early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in ventricular myocytes. *Circulation*. 1995;91:2510-2515.
345. January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type  $Ca^{2+}$  current. *Circ Res*. 1989;64:977-990.

346. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res.* 1994;74:1097-1113.
347. Cranefield PF. Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res.* 1977;41:415-423.
348. Antzelevitch C. Molecular genetics of arrhythmias and cardiovascular conditions associated with arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:1259-1272.
349. Nattel S. Acquired delayed rectifier channelopathies: how heart disease and antiarrhythmic drugs mimic potentially-lethal congenital cardiac disorders. *Cardiovasc Res.* 2000;48:188-190.
350. Hohnloser SH. Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: types, risks, and management. *Am J Cardiol.* 1997;80:82G-89G.
351. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med.* 2004;350:1013-1022.
352. Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol.* 1975;249:469-495.
353. Lakatta EG. Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in the heart. *Cardiovasc Res.* 1992;26:193-214.
354. Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:61-66.
355. Belardinelli L, Isenberg G. Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. *Circ Res.* 1983;53:287-297.
356. Malfatto G, Rosen TS, Rosen MR. The response to overdrive pacing of triggered atrial and ventricular arrhythmias in the canine heart. *Circulation.* 1988;77:1139-1148.
357. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L et al. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res.* 2001;88:1159-1167.
358. Wit AL, Cranefield PF. Triggered activity in cardiac muscle fibers of the simian mitral valve. *Circ Res.* 1976;38:85-98.
359. Vos MA, Gorgels AP, Leunissen JD et al. Flunarizine allows differentiation between mechanisms of arrhythmias in the intact heart. *Circulation.* 1990;81:343-349.



360. Zipes DP, Arbel E, Knope RF et al. Accelerated cardiac escape rhythms caused by ouabain intoxication. *Am J Cardiol.* 1974;33:248-253.
361. Bigger JT, Jr. Digitalis toxicity. *J Clin Pharmacol.* 1985;25:514-521.
362. Lee CO, Kang DH, Sokol JH et al. Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac Purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain. *Biophys J.* 1980;29:315-330.
363. Hauswirth O, Noble D, Tsien RW. Adrenaline: mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibers. *Science.* 1968;162:916-917.
364. Lazzara R, Scherlag BJ. Generation of arrhythmias in myocardial ischemia and infarction. *Am J Cardiol.* 1988;61:20A-26A.
365. Cameron JS, Myerburg RJ, Wong SS et al. Electrophysiologic consequences of chronic experimentally induced left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 1983;2:481-487.
366. Gelband H, Bassett AL. Depressed transmembrane potentials during experimentally induced ventricular failure in cats. *Circ Res.* 1973;32:625-634.
367. Nordin C, Siri F, Aronson RS. Electrophysiologic characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:729-739.
368. Rossner KL, Sachs HG. Electrophysiological study of Syrian hamster hereditary cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 1978;12:436-443.
369. Wiederhold KF, Nilius B. Increased sensitivity of ventricular myocardium to intracellular calcium-overload in Syrian cardiomyopathic hamster. *Biomed Biochim Acta.* 1986;45:1333-1337.
370. Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 1989;69:1049-1169.
371. Katzung BG, Morgenstern JA. Effects of extracellular potassium on ventricular automaticity and evidence for a pacemaker current in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res.* 1977;40:105-111.
372. Cranefield PF, Wit AL, Hoffman BF. Genesis of cardiac arrhythmias. *Circulation.* 1973;47:190-204.
373. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res.* 1977;41:9-18.

374. Yeola SW, Rich TC, Uebele VN et al. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding [see comments]. *Circulation Research*. 1996;78:1105-1114.
375. Franqueza L, Longobardo M, Vicente J et al. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res*. 1997;81:1053-1064.
376. Caballero R, Moreno I, Gonzalez T et al. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res*. 2002;56:104-117.
377. Decher N, Pirard B, Bundis F et al. Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem*. 2004;279:394-400.
378. Zhang H, Zhu B, Yao JA et al. Differential effects of S6 mutations on binding of quinidine and 4-aminopyridine to rat isoform of Kv1.4: common site but different factors in determining blockers' binding affinity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:332-343.
379. Judge SI, Yeh JZ, Goolsby JE et al. Determinants of 4-aminopyridine sensitivity in a human brain Kv1.4 K(+) channel: phenylalanine substitutions in leucine heptad repeat region stabilize channel closed state. *Mol Pharmacol*. 2002;61:913-920.
380. Zhang S, Zhou Z, Gong Q et al. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res*. 1999;84:989-998.
381. Seeböhm G, Chen J, Strutz N et al. Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol Pharmacol*. 2003;64:70-77.
382. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T et al. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9270-9275.
383. Sunami A, Dudley SC, Jr., Fozzard HA. Sodium channel selectivity filter regulates antiarrhythmic drug binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14126-14131.
384. Hockerman GH, Johnson BD, Abbott MR et al. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit. *J Biol Chem*. 1997;272:18759-18765.
385. Sanchez-Chapula JA, Navarro-Polanco RA, Culberson C et al. Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel block. *J Biol Chem*. 2002;277:23587-23595.

386. Sanchez-Chapula JA, Ferrer T, Navarro-Polanco RA et al. Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol.* 2003;63:1051-1058.
387. Paul AA, Witchel HJ, Hancox JC. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine, propafenone and lignocaine. *Br J Pharmacol.* 2002;136:717-729.
388. Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol.* 1994;45:1227-1234.
389. Rolf S, Haverkamp W, Borggrefe M et al. Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:22-31.
390. Yamagishi T, Ishii K, Taira N. Antiarrhythmic and bradycardic drugs inhibit currents of cloned K<sup>+</sup> channels, Kv1.2 and Kv1.4. *Eur J Pharmacol.* 1995;281:151-159.
391. Yeola SW, Snyders DJ. Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res.* 1997;33:540-547.
392. Yue L, Feng JL, Wang Z et al. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res.* 2000;46:151-161.
393. Nattel S, Khairy P, Roy D et al. New approaches to atrial fibrillation management: a critical review of a rapidly evolving field. *Drugs.* 2002;62:2377-2397.
394. Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC et al. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>(+)</sup> current in K<sup>(+)</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res.* 2000;87:160-166.

# **APPENDICES**

## Accord des coauteurs

**Daniel Herrera,**

M.Sc Pharmacologie (N° de programme : 2-520-1-0), Département de Pharmacologie.

**Herrera D., Mamarbachi A.M., Simoes M., Yue L., Parent L., Sauvé R., Wang Z., Nattel S.**  
 Determinants of Antiarrhythmic Drug Action: Flecainide Sensitivity of Voltage-Gated K<sup>+</sup>  
 Channel Subunits Is Influenced by a Single Residue in the S6 Transmembrane Domain (en  
 préparation).

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Daniel Herrera  
 inclus cet article dans son mémoire de thèse de maîtrise qui a pour titre « Déterminants  
 moléculaires de la sensibilité à la flécainide des canaux potassiques voltage dépendants ».

**M. Mamarbachi**

Coauteur



Signature

21.09.04

Date

**M. Simoes**

Coauteur



Signature

le 25/08/2004

Date

**L. Parent**

Coauteur



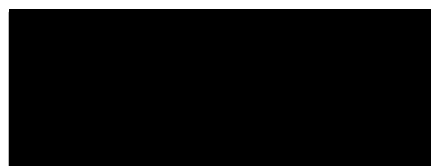
Signature

Sept 9, 2004

Date

**R. Sauvé**

Coauteur



Signature

25/08/2004

Date

**Z. Wang**

Coauteur



Signature

21/09/2004

Date

**S. Nattel**

Coauteur



Signature

23 sept/04

Date