



UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES, CHIMIE DU VIVANT

UNITE INSERM U1069 « NUTRITION CROISSANCE ET CANCER »

**SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA E TERAPIA SPERIMENTALE,
FISIOLOGIA CARDIOVASCOLARE XXIV CICLO**

THÈSE en cotutelle entre France et Italie présentée par :

Fabio FERRO

soutenue le : 11 décembre 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

REGULATION DES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES PAR LES ACYLCARNITINES

THÈSE dirigée par :

M. LABARTHE François

M. LEVI Renzo

Et co-encadré par :

M. BABUTY Dominique

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours
Professore Associato, université de Turin, Italie

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. BOIS Patrick

M. VANDECASTEELE Gregoire

Professeur des Universités, Université de Poitiers
Directeur de Recherche INSERM, Paris

JURY :

M. BABUTY Dominique

M. BOIS Patrick

Mme. GIUSTETTO Carla

M. LABARTHE François

M. LEVI Renzo

M. VANDECASTEELE Grégoire

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours
Professeur des Universités, Université de Poitiers
Ricercatore universitario, Université de Turin, Italie
Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours
Professore Associato, Université de Turin, Italie
Directeur de Recherche INSERM, Paris

MEMBRE INVITE' :

LE GUENNEC Jean-Yves

Professeur des Universités, Université de Montpellier-2

A mia madre, a mia sorella.

A Simone, a Silvia.

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire « Nutrition Croissance et Cancer »

INSERM U1069 de l'université François-Rabelais de Tours, dirigé par le Pr. Philippe BOUGNOUX et par le Pr. Stéphane CHEVALIER à partir de l'année 2012.

Il a été également réalisé dans le Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi de l'università degli studi di Torino dirigé par le Pr. Gianfranco GILARDI.

Cette thèse a été dirigé par le Pr. François LABARTHE et co-encadrée par le Pr. Dominique BABUTY de l'université de Tours. Elle a été également dirigé par le Pr. Renzo LEVI de l'università di Torino.

Remerciements

Après ces quatre ans de doctorat, je tiens à remercier ceux qui m'ont permis de faire ce travail, dans les laboratoires et dehors.

Je souhaite remercier le Pr. Philippe Bougnoux et le Pr. Stéphan Chevalier, directeurs successifs de l'unité Inserm U1069 (ex U921) « Nutrition, Croissance et Cancer » de Tours, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 et mon travail de thèse au sein de ce laboratoire.

Ringrazio ugualmente il Prof. Poli per aver accettato il mio arrivo nel Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, laboratorio di Fisiologia Cardiovascolare di Torino.

Je souhaite remercier le Pr. Patrick Bois et le Pr. Grégoire Vandecasteele pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Vorrei ugualmente ringraziare la Dr. Carla Giustetto per aver accettato di far parte della commissione di tesi come esaminatrice.

Je remercie le Pr. François Labarthe et le Pr. Dominique Babuty, mon directeur et co-directeur de thèse français, pour m'avoir suivi pendant ces quatre ans de doctorat. Merci de m'avoir laissé la liberté de vérifier mes idées et choisir ensemble la direction à suivre.

Al Prof. Renzo Levi devo la scoperta dell'elettrofisiologia durante la laurea specialistica, passione che mi ha portato fino a qui. Lo ringrazio ugualmente come direttore italiano dello stage in Francia durante la laurea specialistica e direttore di tesi durante il dottorato. Ringrazio anche la Prof. MariaPia Gallo per l'aiuto durante il mio periodo in Italia.

Desidero ringraziare il prof. Giuseppe Poli per i preziosi consigli.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Yves Le Guennec de l'Université de Montpellier (ex tourangeaux !) pour m'avoir initié à la théorie et à la pratique du patch-clamp et pour m'avoir montré la passion pour cette discipline. Merci pour avoir été mon directeur de stage français pendant l'M2 et avoir eu confiance en moi de suite. Et merci pour avoir suivi strictement à partir de mon stage M2 jusqu'à la fin de cette thèse, même après être parti au sud. Et aussi pour avoir répondu « non ! » quand tout était noir. On peut dire que c'a marché.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe de enseignement de la faculté de Science de Grandmont dont j'ai fait partie (Christophe Vandier, Marie Potier, Sebastien Roger, Nicolas Peineau, François Gannier) pour m'avoir permis de faire l'expérience de l'enseignement pendant mon monitorat. J'ai bien appréciée, peut être je continuerai sur ce chemin...

Un remerciement à Jean-Yves Le Guennec, Dominique Babuty et François Labarthe pour m'avoir permis de participer aux différents congrès (printemps de la cardiologie, canaux ioniques, les automnales du GRRC,...). Expériences toujours très enrichissantes et agréables. Je tiens à remercier le Pr. Christophe Vandier pour la disponibilité pour les nombreux discussions concernant l'électrophysiologie. Je le remercie également pour m'avoir aidé pendant les démarches à suivre pour la rédaction et la soutenance de la thèse et les conseils pour mon doctorat et la suite.

Pierre Besson, celui qui a une réponse à toute question, de la biologie et non. Et si la réponse on l'a pas tout de suite, on la trouve. Celui qui arrange tous les problèmes. Et merci pour ton intérêt pour l'italien et pour m'avoir aidé à apprendre le français.

Seb, merci pour tous les précieux conseils scientifiques, pour toutes les blagues, les congrès ensemble à Canaux Ioniques, pour avoir participé à créer l'ambiance du n2c et m'avoir montré comme on peut travailler de façon très efficace et en s'amusant.

Je tiens à remercier Lucie Clarysse et Laure Peyta pour le travail de « proof-reading » pour le français de ma rédaction. A savoir, on dit pas « acyle » mais « longueur de la chaîne carbonée ». Et on dit pas « bout » mais « extrémité » de la pipette.

Bref, un grand remerciement à Christophe Vandier, Sébastien Roger, Lucie Clarysse, Laure Peyta. Sans vous, la rédaction et la soutenance auraient été beaucoup plus difficiles et le résultat moins appréciable.

Un salut à tous les professeurs du n2c, Jean-François, Stéphane Servais, Karine, Karo, Jacques, Gunther, avec qui j'ai pas eu la possibilité de travailler beaucoup mais ils ont participé à rendre agréable mon période au n2c.

Un grazie al Prof. Davide Lovisolo e al Prof Luca Munaron per le discussioni avute, seppure non numerose purtroppo.

Un saluto à l'équipe de Montpellier, (Jerome, Alain, Jeremy,...). J'aurais voulu travailler avec vous, malheureusement c'est n'a pas été possible.

Un doveroso ringraziamento a mia sorella Cristina che mi ha spinto a fare l'Erasmus in Francia durante la laurea specialistica. Grazie à quel periodo, è stato possibile questo dottorato e tutto ciò che ne è legato.

Salut Cat! Catherine, la secrétaire plus efficace du monde. Comment ferions nous, sans toi ??

Isabelle Domingo et Amandine Pinet (Pineeeet !), Chi est Luigi ??

Merci au laboratoire « Nutrition Croissance et Cancer » et à tous les collègues n2ceennes qui ont permis de rendre l'ambiance de ce laboratoire si agréable et efficace. Je sais pas dans quel

ordre vous écrire... A partir de Tran, Ludovic, Aude, Sophie (ma collegue du bureau !!), Romain, Bilel, Mimsy, Lucie Clarysse (stoi Lucie !), Ramez « Rams », Laure, Virginie, Antony, Lucie Chauvin, Amandine Pinet, Joan, Lucie Brisson,. Bonne courage pour les nouveaux doctorants (Émeline, Stéphanie, Maxime, Audrey). Comment travailler de façon efficace et s’amuser.

Un saluto aux doctorants tourangeaux qui ont même partagé l’expérience du Monitorat (Mimsy, Aurelie, Mimsy, Grégoire, Olivia,..)

Merci à tous ceux qui ont eu la patience de faire l’effort de comprendre un rital qui parle français avec son accent bizarre et merci à tous ceux (dans le laboratoire et dehors) qui m’ont aidé à améliorer mon français jours après jours. Qu’il soit claire, je ne suis toujours pas espagnol. Je mange des pates moi. Sans ketchup.

Ciao ai miei colleghi dottorandi e laureandi del DBAU di Torino : Sara, Eleonora, Federico, Tullio, Clara, Alessandra Fiorio, Susanna, Alessandra, Daniele, Edoardo, Marika.

Un ciao à mes collègues étudiants du stage du Master 2 en France : Tran, Yves, Marie, Aurelia, Aude. Heureusement la plupart de vous, je vous ai retrouvé plus tard ! Quelqu’un melme à la Guinguette...

Tutti gli amici durante l’università di Torino, triennale e specialistica, per i bei momenti, pause caffè ovunque, giardini, aperitivi, cene e tutti i bei momenti passati insieme.

Un grande ciao a tutti gli Erasmus (Andrea, Ludovica, Francesca, Francesca, Marta (ti metto tra gli Erasmus o tra i Pap?, Virginia), Alice, Ioanna, Marie et Hélène (vous vous etez incrustées !), Rachel, Ares, Fausto, Loreto, Luis, Eirini, Athina, Jesse,...), ci si rivedrà.

Merci à la Pap et à tous les Papiniers, toutes les générations. Once Pap, is forever.

Merci à la France pour m’avoir fait découvrir l’expérience enrichissante et parfois compliqué de la colocation.

Salam à mes amis Hasan, Luma, Karem.

Bah, ringrazio anche tutti quelli che hanno pregato per me, ognuno a modo suo, compresi coloro che alle 6 di sera parlavano della Chiesa da sotto i ponti.

“Dunque io ringrazio tutti quanti, specie la mia mamma che mi ha fatto così funky”.

Grazie “Zio” e “Zia”, vi dobbiamo molto.

Desidero ringraziare Silvano per averci dato una mano a stare in piedi, facendo sembrare tutto più facile. Ora, tieni botta !

Per Simone (e genitori) e Silvia.

Résumé

Plusieurs maladies entraînent des désordres du métabolisme des acides gras (AG) à différents niveaux. Les conséquences de ces désordres sont soit une augmentation soit une diminution du taux d'AG et de leurs dérivés circulants, notamment les acyl-carnitines (AC) (les acyl-coenzyme A (acyl-CoA) peuvent également augmenter mais ils restent confinés à l'intérieur de la cellule). Ces mêmes maladies sont aussi associées aux perturbations électriques de l'activité cardiaque, à des troubles du rythme et à la morte subite. Le changement de concentration des AG et surtout des AC, en particulier des AC à chaîne longue (LCAC), a été soupçonné comme étant la cause de ces dérangements électriques. Plusieurs études ont montré que les LCAC et les AG à concentration élevée peuvent moduler les canaux ioniques cardiaques. Toutes ces études ont utilisé une seule, voire deux LCAC. Les concentrations utilisées dans ces études, ne permettent aucune comparaison avec l'effet d'une concentration comparable à la situation physiologique : les concentrations utilisées correspondent à des concentrations pathologiquement élevées *in vivo*. Jusqu'ici aucune étude n'a évalué l'effet des LCAC sur les canaux ioniques cardiaques repolarisants.

Nous avons testés l'effet des plusieurs AG, d'AC de différentes longueurs de la chaîne carbonée et de la carnitine libre (CAR), sur les trois canaux ioniques cardiaques potassiques repolarisants (I_{KR} , I_{KS} et I_{K1}), et sur le canal calcique du type L (I_{CaL}) qui permet la phase du plateau dans le ventricule. Les concentrations utilisées ici ont été comprises entre 0 et 30 μM , avec comme référence la concentration physiologique de 3 μM . Nous avons montré que les AC modulent le canal hERG de façon spécifique. Cette régulation a lieu du côté extracellulaire et ne concerne que les LCAC exclusivement. Les LCAC ont deux effets opposés sur le canal hERG: une ouverture du courant de fenêtre et une augmentation de la vitesse de la cinétique de désactivation. Aucun AC testé n'a eu d'effet s'il était ajouté en intracellulaire, indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée. La carnitine libre et les AC à chaîne moyenne (MCAC) n'ont eu aucun effet en extracellulaire et ce, jusqu'à 30 μM . Les mêmes expériences réalisées sur I_{KS} et sur I_{K1} ont montré que les LCAC ne modulent pas ces canaux. Enfin, l'étude des effets des C16-CAR et de l'acide palmitique sur le courant I_{CaL} dans la lignée HEK293- I_{CaL} et dans des cardiomyocytes de rat, ont montré que le canal $Ca_v1.2$ est modulé par ces molécules à la concentrations de 3 μM , entraînent une stabilisation du « run-down » *in vitro*. Les résultats obtenus sur ce dernier canal et l'hypothèse formulée,

restent à confirmer avec des expériences complémentaires et *via* l'utilisation d'autres techniques d'électrophysiologie.

Ces résultats montrent qu'en condition physiologique il y a une modulation permanente du canal hERG par les LCAC. Il existe un lien strict entre le métabolisme énergétique et l'activité électrique cardiaque. Dans certaines maladies (comme l'infarctus, le diabète et certaines maladies génétiques touchant la β -oxydation des AG) il y a une importante augmentation de LCAC circulants. Dans d'autres états pathologiques (notamment la déficience primaire systémique en carnitine) la concentration de ces molécules est très faible. Les deux conditions pathologiques sont associées à des perturbations de l'activité électrique cardiaque, à des troubles du rythme et à la mort subite. La régulation par les LCAC du canal hERG que nous avons démontrée ici et peut être celle du canal I_{CaL} , pourraient participer au dérangement électrique à l'origine du déclenchement de troubles du rythme cardiaque.

Cette étude a permis d'améliorer la compréhension de la régulation physiologique des canaux impliqués dans la repolarisation et la phase de plateau du PA cardiaque par les LCAC. De plus, le mécanisme d'action de ces molécules soupçonnées être impliquées dans certaines situations pathologiques a été en partie élucidé. Ceci permettrait d'envisager des études *in vitro* ultérieures, et pourquoi pas *in vivo*, qui pourraient à terme mener au développement de thérapies visant à améliorer les signes et symptômes provoqués par les perturbations électriques observées dans certaines maladies.

Mots clés : électrophysiologie cardiaque, métabolisme lipidique, troubles du rythme, canaux ioniques, acides gras, acyl-carnitines.

Abstract

Several diseases can cause either an increase or a decrease in the rate of fatty acids (FAs) and their derivatives circulating, including acyl-carnitines (AC). This change is suspected as being the cause of major cardiac electrical perturbations. We have shown that long-chain AC (LCAC) modulate specifically by the extracellular side the hERG channel, regulating its current amplitude and kinetics. All AC tested had no effect when applied intracellularly. Carnitine and medium chain AC had no effect on hERG. LCAC does not modulate I_{K1} nor I_{KS} . $Ca_v1.2$ channel is modulated by C16 and C16-CAR in HEK293- I_{CaL} cell line and rat cardiomyocytes. In physiological conditions there exists a strict link between energy metabolism and cardiac electrical activity which causes a permanent modulation of hERG channel by the LCAC. Regulation by the LCAC of the hERG channel and maybe I_{CaL} , could participate in the electrical disturbance causing the onset of cardiac arrhythmia found in certain diseases.

Keywords: Cardiac Electrophysiology, lipid metabolism, arrhythmias, ion channels, fatty acids, acyl-carnitine.

Publication

Ferro F., Ouillé A., Tran T.-A., Fontanaud P., Bois P., Babuty D., Labarthe F., Le Guennec J.-Y. 2012. “Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel
PLOS ONE 7(7):e41686.

Congrès

- Printemps de la Cardiologie (2009), Nancy. Présentation orale et poster affiché
- Canaux Ioniques (2009), Toulon. Poster affiché.
- Printemps de la Cardiologie (2010), Nantes. Poster affiché
- Canaux ioniques (2010), Toulon. Poster affiché.

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	8
Abstract	10
Publication.....	11
Congrès.....	11
Liste des figures	16
Liste des abréviations	18
1 Introduction	21
1.1 Canaux ioniques cardiaques	22
1.1.1 Le courant potassique I_{KR}	23
1.1.2 Le courant potassique I_{KS}	26
1.1.3 Le courant potassique I_{K1}	28
1.1.4 Le courant calcique I_{CaL}	30
1.2 Métabolisme énergétique des acides gras.	34
1.2.1 Métabolisme des acides gras.	34
1.2.2 Concentration physiologique de la carnitine et de ses dérivés.....	38
1.2.3. Métabolisme de la carnitine.	39
1.3 Lien entre acides gras et canaux ioniques.	41
1.3.1 Effets des acides gras et de leurs dérivés sur les canaux ioniques cardiaques.....	41
1.3.2 Troubles du rythme et accumulation en acyl-carnitines.....	43
1.3.2.1 Infarctus du myocarde.....	44
1.3.2.2. Diabète.	45
1.3.2.3 Déficit génétiques de la β -oxydation des acides gras.....	46
1.3.2.4 Toxicité des LCAC ?.....	47
1.3.3 Troubles du rythme et diminution de la concentration en acyl-carnitines.	47
1.3.3.1 Déficit Systémique Primaire en Carnitine (PSCD).....	48
1.3.3.2 Rôle régulateur des acyl-carnitines à chaîne longue sur les canaux ioniques cardiaques ?.....	49
2 Objectifs de la thèse	50
2.1 Démontrer le lien entre acyl-carnitines à chaîne longue et activité électrique cardiaque.	
51	
2.2 Choix des molécules testées sur les canaux ioniques.....	53

2.3 Choix des canaux ioniques testés.....	54
3 Publication. “Long Chain Acyl-carnitines regulate the hERG channel”. Ferro et al., PLOS ONE, 2012.....	55
4 Matériels et Méthodes supplémentaires. Configurations du patch – clamp utilisées.....	66
4.1 Configuration « patch rompu » ou « whole – cell ».....	67
4.2 Configuration « patch perforé ».....	69
5 Résultats Complémentaires (I_{CaL})	72
5.1 Matériels et Méthodes Complémentaires pour l’étude du canal calcique du type L.	74
5.1.1 Solutions utilisées pour l’étude du canal calcique.	74
5.1.2 Le courant HEK293- I_{CaL}	77
5.1.2.1 Protocole I_{CaL} 5s.	79
5.1.2.2 Protocole courant-voltage « I_{CaL} – V ».	80
5.1.3 Courant I_{CaL} des cardiomyocytes	81
5.1.3.1 Protocole I_{CaL} pour les cardiomyocytes.....	82
5.2 Résultats obtenus sur I_{CaL} exprimé dans les cellules HEK293. Acyl-carnitines vs acide gras.	84
5.3 Résultats obtenus sur I_{CaL} exprimé de façon native dans des cardiomyocytes	90
6 Discussion	91
6.1 Les acyl-carnitines à chaine longue régulent les canaux ioniques cardiaques.....	92
6.1.1 Les acyl-carnitines à chaine longue régulent le canal hERG de façon spécifique.....	92
6.1.2 Les acides gras et les acyl-carnitines à chaine longue régulent le canal $Ca_v1.2$ <i>via</i> pourcentage de canaux fonctionnels sur la membrane.....	94
6.1.3 Modulation physiologique du canal hERG et du canal $Ca_v1.2$ par les acyl-carnitines à chaine longue.....	98
6.1.3 Confirmation de l’hypothèse du lien entre concentrations pathologiques des LCAC et troubles du rythme.....	99
6.1.4 Lien entre métabolisme énergétique et activité électrique cardiaque.....	102
6.2 Limites de cette étude.....	103
6.2.1 Les protéines transfectées.....	103
6.2.2 Le modèle cellulaire HEK293	104
6.2.3 Résultat de la modélisation	104
6.3 Perspectives.....	106
6.3.1 Autres canaux ioniques cardiaques	106

6.3.2 Compléter l'étude des effets des LCAC sur I_{CaL} dans les cardiomyocytes.....	106
6.3.3 Current-clamp sur cardiomyocytes	107
6.3.4 Souris <i>jvs</i> ou animaux traités au mildronate.....	107
6.4 Conclusions	110
Bibliographie.....	112
Résumé	120
Abstract	120

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition du MIP pour l'étude du courant calcique pour les cellule HEK293- I_{CaL}	74
Tableau 2. Composition du PSS pour l'étude du courant calcique pour les cellule HEK293- I_{CaL}	75
Tableau 3. Composition du MIP pour l'étude du courant calcique de type L dans les cardiomyocytes de rat.....	76
Tableau 4. Composition du PSS pour l'étude du courant calcique de type L dans les cardiomyocytes de rat.....	76

Liste des figures

Figure 1. Liste des gènes codants pour les sous-unités principale α et si elle(s) est(sont) présente(s), de leur sous-unité β – auxiliaire(s) des canaux ioniques cardiaques.	22
Figure 2. Structure du canal hERG.	24
Figure 3. Cinétique du canal hERG.	25
Figure 4. A et B. Structure du canal KvLQT1 et minK.	27
Figure 5 : Expression transitoire de KvLQT1 (A) et KvLQT1+MinK (B) dans les cellules COS.	27
Figure 6 : Schéma du canal responsable du courant potassique cardiaque à rectification entrante, I_{K1} . A Tétramère qui compose le canal, chaque sous-unité dispose de deux domaines transmembranaires et d'une boucle-P qui forment le canal. B : Vue extracellulaire du canal. Modifié d'après Collins <i>et al.</i> 1997.	28
Figure 7. Relation courant – voltage (I-V) de I_{K1} dans un cardiomyocyte de ventricule.	29
Figure 8. Transport du canal Ca^{2+} dans le myocyte cardiaque.	31
Figure 9 : Structure 3D des canaux ioniques calciques voltage dépendants.	32
Figure 10. Schéma des voies d'entrée des AG dans la cellules et de leur β -oxydation dans la mitochondrie au niveau cardiaque.	36
Figure 11. Structure 3D de l'acetyl-CoA.	36
Figure 12. Structure 3D de la carnitine.	39
Figure 13. Réserves de carnitine dans le corps et turn-over lié à l'alimentation, la synthèse et l'excrétion urinaire par jour. D'après Stanley, 2004.	39
Figure 14. Représentation du patch – perforé.	70
Figure 15. Schéma de la pipette du patch contenant la nystatine.	71
Figure 16. Évolution au cour du temps de l'amplitude de I_{CaL} d'un cellule HEK293- I_{CaL} représentative en condition de MIP et PSS contrôle.	78
Figure 17. Exemple de tracé et schéma du protocole de stimulation « Depol ».	79
Figure 18. Représentation du tracé du courant HEK293- I_{CaL} obtenu grâce au protocole I_{CaL} -V.	80
Figure 19. Effet de la perfusion de C16-CAR a 3 μ M. Cellule représentative.	84
Figure 20. Effet du C16-CAR et C16-CAR + C16ME à 3 μ M chaque sur I_{CaL} . Pic de courant en fonction du temps. Cellule représentative.	85
Figure 21. Effet du C16ME et C16ME + C16-CAR à 3 μ M chaque sur I_{CaL} . Mesure du pic de courant en fonction du temps. Cellule représentative.	86

Figure 22. Courant relatif du canal $Ca_v1.2$ en condition contrôle (PSS), avec C16ME, avec C16ME + C16-CAR et avec C16-CAR. Cellule représentative, les autres cellules ont donnés résultats comparables.	87
Figure 23. Courbes de disponibilité de I_{CaL} dans les différentes conditions. Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.	88
Figure 24. Mesure de la première constante de temps du I_{CaL} . Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.....	89
Figure 25. Mesure de la seconde constante de temps du I_{CaL} . Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.	89
Figure 26. Évolution de l'effet sur I_{CaL} de C16-CAR et C16ME sur un cardiomyocyte de rat.	90
Figure 27. PA de myocytes isolés à partir de l'épicarde (Epi), du midmyocarde (M) et de l'endocarde (Endo) d'un ventricule gauche de chien.....	100

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique, Acido Arachidonico.

AC : Acyl-Carnitine, acil-carnitina.

ACS : Acyl-Coenzyme A Synthase.

AG : Acide Gras, Acido Grasso.

AGCC : Acide Gras à Chaîne Courte, Acido Grasso a Catena Corta.

AGCM : Acide Gras à Chaîne Moyenne, Acido Grasso a Catena Media.

AGCL : Acide Gras à Chaîne Longue, Acido Grasso a Catena Lunga.

Acyl-CoA : Acyl-Coenzyme A.

ATP : Adenosine Triphosphate, Adenosina Trifosfato.

BrS : Brugada Syndrome, Syndrome de Brugada, Sindrome di Brugada.

C8-CAR : octanoyl-carnitine.

C10 : decanoyl-carnitine

C16 : hexadecanoyl-carnitine (palmitoyl-carnitine).

C18-CAR : octadecanoyl-carnitine (oleoyl-carnitine).

CACT : Carnitine-Acyl-Carnitine Transferase.

CAR : carnitine, carnitina.

Ca_v : canal calcique voltage-dependant, canale de calcio voltaggio-dipendente.

CHO : Chinese Hamster Ovary cell line.

CPT : Carnitine Palmitoyl Transferase, Carnitina Palmitoil Transferasi.

DHA : Acide Docosahexaénoïque, Acido Docosaenoico.

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO : Dimethyl sulfoxyde, Dimetil sulfossido.

DPA : Durée du Potentiel d'Action, Durata del Potenziale d'Azione.

EPA : Acide Eicosapentaénoïque, Acido Eicosapentaenoico.

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cell line.

JVS : Juvenil Visceral Steathosis.

K_{ir} : canal potassique rectifiant dans le sens entrant, canale del potassio inward rectifier.

K_v : canal potassique voltage-dependant, canale del potassio voltaggio-dipendente.

LCAC : Long Chain Acyl-Carnitine, Acyl-Carnitine à Chaine Longue, Acil-Carnitina a Catena Lunga.

LCAD : Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, Acyl-CoA Dehydrogenase pour les acides gras à chaine Longue, Acil-CoA Deidrogenasi per gli acidi grassi a catena Lunga.

LCHAD : Long-Chain-3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase.

LPC : lysophosphotidylcoline, lisofosfatidilcolina.

LQTS : Long QT Syndrome, Syndrome du QT long, Sindrome del QT lungo.

MCAD : Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, Acyl-CoA Dehydrogenase pour les acides gras à chaine Moyenne, Acil-CoA Deidrogenasi per gli acidi grassi a catena media.

MIP : Milieu Intra Pipette, Soluzione Interna alla pipetta.

Na_v : canal sodique voltage-dependant, canale per il sodio voltaggio-dipendente.

NCBI : National Center Biotechnology Information.

NCX : échangeur Na^+/Ca^{2+}

OCTN2 : Organic Cationic Transporter Sodium-Dependent type 2.

PA : Potentiel d'Action, Potenziale d'Azione.

PSCD : Primary Systemic Carnitine Deficiency, Deficiencia Primaria Sistemica en Carnitine, Deficit Primario Sistemico in Carnitina.

PSS : Physiological Standard Solution.

RS : réticulum sarcoplasmique, reticolo sarcoplasmatico.

RyR : récepteur à la ryanodine, recettore rianodinico.

SCAD : Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, Acyl-CoA Dehydrogenase pour les acides gras à chaîne courte, Acil-CoA Deidrogenasi per gli acidi grassi a catena corta.

SQTS : Short QT Syndrome, Syndrome du QT court, Sindrome de QT corto.

SVF : Sérum de Vœu Fœtal, Siero Fetale Bovino.

TG : triacylglycérol, triacilgricerolo.

TM : trans-membranaire.

VLCAD : Very Long Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase, Acyl-CoA Dehydrogenase pour les acides gras à chaîne très longue, Acil-CoA Deidrogenase per gli acidi grassi a catena molto lunga.

1 Introduction

1.1 Canaux ioniques cardiaques

L'activité électrique physiologique du cœur est déterminée par la propagation de la stimulation électrique qui est le résultat de la dépolarisation rapide et de la repolarisation lente des cellules cardiaques. La recherche des causes au niveau moléculaire et cellulaire des arythmies cardiaques a été à l'origine de l'intérêt porté aux gènes, à la structure et au mécanisme de fonctionnement des canaux ioniques cardiaques. Au cours du XX^{ème} siècle, les connaissances dans ce domaine ont évolué : en partant de la description clinique des arythmies jusqu'à une description précise des potentiels d'action spécifiques des différentes régions du tissu cardiaque, ainsi qu'à l'identification des canaux ioniques impliqués.

Les cellules cardiaques expriment plusieurs canaux ionique (figure 1). En fonction de la région cardiaque (sinus, oreillettes, ou ventricules) et du tissu étudié (épicaarde, midmyocarde ou péricarde) le profil d'expression des différents canaux ioniques varie. Ces variations d'expression (types et degré d'expression) ont pour conséquence la génération de potentiels d'action (PA) différents en forme et en durée (Antzelevitch 2007; Roden et al. 2002).

Current	α Subunits		β Subunits	
	Gene	Human chromosomal location	Gene	Human chromosomal location
Inward currents				
I_{Na}	SCN5A	3p21	β_1 (SCN1B) β_2 (SCN2B)	19q13.1-q13.2 11q23
I_{Ca-L}	α_1C (CACNL1A1)	12pter-p13.2	β_1 (CACNB1) β_2 (CACNB2) $\alpha_2\delta$ (CACNA2D1)	17q21-q22 10p12 7q21-22
I_{Ca-T}	α_1H (CACNA1H)	16p13.3		
Outward currents				
I_{Ks}	<i>KvLQT1</i> (KCNQ1)	11p15.5	<i>minK/IsK</i> (KCNE1)	21q22.12
I_{Kr}	<i>HERG</i> (KCNH2)	7q36-q36	<i>minK/IsK</i> (KCNE1) <i>MiRP1</i> (KCNE2)	21q22.12 21q22.12
I_{Kur}	<i>Kv1.5</i> (KCNA5)		<i>Kvβ1</i> (KCNA1) <i>Kvβ2</i> (KCNA2 ??)	3q26.1 1p36.3
I_{Ki}	<i>Kir2.1</i> (KCNJ2) <i>Kir2.2</i> (KCNJ12)	17q 17p11.1		
I_{K-Ach}	<i>GIRK1</i> , <i>Kir3.1</i> (KCNJ3) + <i>GIRK4</i> , <i>Kir3.4</i> (KCNJ5)	2q24.1 11q24		
I_{K-ATP}	<i>Kir6.2</i> , <i>BIR</i> (KCNJ11)	11p15.1	<i>SUR2</i> (ABCC9)	12p12.1
I_{TO}	<i>Kv4.3</i> (KCNQ3) <i>Kv1.4</i> (KCNA4)	1p13.2 11p14		
I_f , I_h (pacemaker current)	<i>BCNG2</i> , <i>HCN2</i> <i>HCN4</i>	19p13.3 15q24-q25		
I_{Kp}	<i>TWIK1</i> (KCNK1) <i>CFTR</i> (ABCC7) <i>KvLQT1</i> (KCNQ1)	1q42-q43 7q31.2 11p15.5	<i>MiRP1</i> (KCNE2)	21q22.12

Figure 1. Liste des gènes codants pour les sous-unités principale α et si elle(s) est(sont) présente(s), de leur sous-unité β – auxiliaire(s) des canaux ioniques cardiaques.

Pour les gènes, sont indiqué leurs noms historiques et ceux utilisés dans la classification actuelle. Information prises sur le site NCBI (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov>) D'après Roden *et al.*, 2002.

Je vais décrire les quatre courants cardiaques testés pendant notre étude: I_{KS} , I_{KR} , I_{K1} et I_{CaL} . Trois de ces canaux (I_{KS} , I_{KR} et I_{CaL}) sont voltage-dépendants, comme la plupart des canaux. Le quatrième (I_{K1}) est retrouvé dans la classe des canaux rectifiants dans le sens entrant. Les canaux voltage-dépendants ont une structure commune : un homotétramère pour lequel chaque monomère est constitué de six segments transmembranaires (6TM) (voir figure 2 pour le canal hERG). Cette protéine est la sous-unité α et forme le pore de sélectivité qui permet le passage des ions. Certains canaux sont aussi couplés à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires qui régulent la cinétique du canal, son adressage et/ou son ancrage membranaire.

1.1.1 Le courant potassique I_{KR}

Le courant I_{KR} , avec le courant I_{KS} , est une des composantes du courant I_K , également appelé « delayed rectifier », c'est-à-dire retardé et rectifiant. En effet, lors d'une dépolarisation membranaire (créneau de voltage imposé en patch-clamp), ce courant apparaît avec un certain retard. I_{KR} est qualifié de rectifiant dans le sens entrant du fait qu'il ne suit pas la loi de Goldman-Hodgin-Katz (GHK). C'est pourquoi ces canaux ne jouent pas de rôle important dans la balance de courant entrants et sortants impliqués dans la phase du plateau du PA. Les trois courants potassiques étudiés ici sont tous des courants sortants que l'on retrouve dans la phase de repolarisation finale du PA ventriculaire. Les deux courants potassiques I_{KR} et I_{KS} ont une sélectivité identique au potassium mais leur cinétique et leur sensibilité aux molécules sont très différentes (Roden *et al.*, 2002).

Le gène hERG (human Ether-à-go-go Related Gene) est le gène KCNH2 qui code pour la sous-unité α de la protéine Kv11.1 qui donne le courant I_{KR} . Cette sous-unité s'assemble avec la sous-unité β dite minK codé par le gène KCNE1, et celle-ci semble augmenter l'amplitude du courant. La deuxième sous-unité β est appelée minK-related protéine 1 (MiRP1) codée par le gène KCNE2, qui augmenterait la vitesse de désactivation et la sensibilité du canal à certains médicaments (Roden *et al.*, 2002).

La séquence génomique du hERG est très conservée chez les mammifères. Il est exprimé dans toutes les espèces.

Le canal hERG présente une cinétique unique parmi les canaux potassiques. La transition entre l'état ouvert et l'état fermé est plutôt lente, par contre celle entre l'état ouvert et l'état inactivé est très rapide. Cette inactivation serait très rapide grâce à une boucle appelée P-loop (portion d'acides-amines entre le segment S5 et S6) très courte, qui permet une inactivation du type C, donc au niveau du pore (inactivation extracellulaire) plutôt que du type N dite « ball-and-chain » (inactivation intracellulaire). Cette caractéristique d'activation et de désactivation lentes et d'inactivation rapide, confère au canal hERG son importance dans la phase finale de repolarisation cardiaque. Malgré sa qualification de « courant potassique à activation rapide », le courant I_{KR} n'apparaît pas tout de suite dans la phase de repolarisation. En effet, il arrive plus doucement que le courant I_{KS} du fait de sa voltage dépendance. Pendant la phase de plateau, les canaux hERG sont presque totalement inactivés. Quand le PA rentre dans la phase de repolarisation grâce au courant I_{KS} , le courant I_{KR} se réactive et permet un courant sortant conséquent, qui accélère la repolarisation (figure 3).

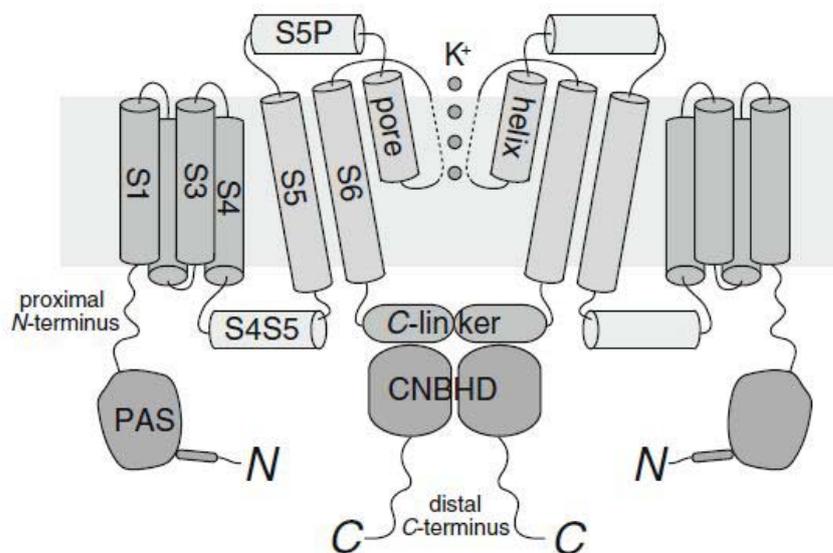


Figure 2. Structure du canal hERG.

Ce canal est un tétramère. Dans ce schéma on montre que deux sous-unité du canal pour simplicité. S5, S6, le linker S5-S6 forment le pore de sélection. Chaque monomère se lie aux autres grâce à le domaine C-terminale dit C-linker. PAS = PAS domaine. CNBHD = Cyclic Nucleotide – binding homology domain. D'après Ann Ng et al, 2012.

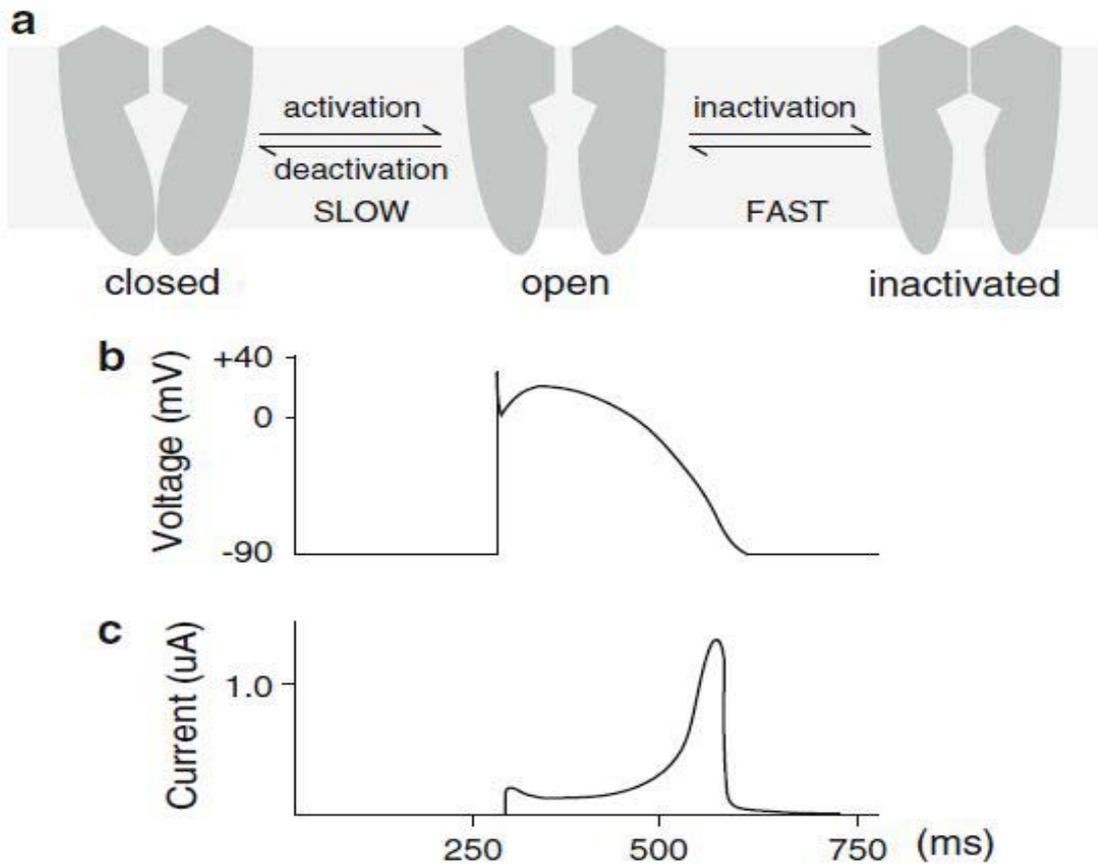


Figure 3. Cinétique du canal hERG.

A. On peut trouver le canal hERG dans trois états : fermé (à gauche), ouvert (au milieu), et inactivé (à droite). La transition du canal entre ces stades est voltage – dépendant. Quand la cellule est au potentiel de repos, le canal est fermé. La dépolarisation de membrane active lentement le canal qui entraîne l’ouverture d’une porte intracellulaire (état ouvert). La dépolarisation membranaire maintenue inactive rapidement, probablement par le fermeture du pore du coté extracellulaire (état inactivé). La repolarisation de la membrane réactive le canal et permet le passage des ions (état ouvert). B. Représentation schématique d’un PA ventriculaire. C. Courant du canal hERG (I_{KR}) qui participe à la phase finale de la repolarisation. D’après Chai Ng et al., 2012.

La perte de ces caractéristiques concernant la cinétique du canal hERG (mutations ou blocages pharmacologiques), qui entraînent un perte de fonction, a comme conséquence un rallongement dans la durée du PA (Clancy and Y. Rudy 2001). Le canal hERG est la cible de plusieurs molécules capables de rallonger la durée du QT, pouvant entraîner des arythmies

ventriculaires et des Torsades de Pointe (TdP), comparables à celles retrouvées dans le syndrome du QT long génétique (LQTS) du type 2 (LQT2). (Hedley et al. 2009; Roden et al. 2002). Au contraire, une mutation de ce canal qui lui confère un gain de fonction, peut entraîner la manifestation du syndrome du QT court (SQTS) de type 1 (SQT1) (Hedley et al., 2009).

1.1.2 Le courant potassique I_{KS}

Contrairement au courant I_{KR} , le courant I_{KS} n'est pas ubiquitaire chez les mammifères. Dans certaines espèces comme l'homme, le chien et le cobaye, le courant potassique retardé (I_K) est composé de I_{KR} et de I_{KS} . Chez d'autres animaux comme le chat, le lapin et la souris (stade fœtal seulement), la composante I_{KS} est totalement absente.

Ce canal est formé par la sous-unité principale KvLQT1 et la sous-unité auxiliaire minK. La sous-unité principale est codée par le gène KCNQ1, également appelée KvLQT1 car la mutation de ce gène peut être associée au syndrome du QT long du type 1 (LQT1). La protéine est appelée Kv7.1 et doit être associée avec la sous-unité minK et la sous-unité MinK Related Protein 2 (MiRP2) pour donner le courant I_{KS} . Le canal ainsi formé possède la structure classique des canaux potassiques voltage-dépendants, un homotétramère au sein duquel chaque monomère est constitué d'une protéine à six domaines transmembranaires. Comme pour tous les canaux potassiques voltage-dépendants, le segment S4 forme le senseur de voltage et les intersegments S5-S6 le domaine du pore (figure 4).

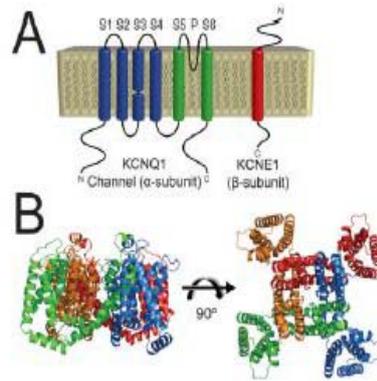


Figure 4. A et B. Structure du canal KvLQT1 et minK.

KCNQ1 est un canal voltage-dépendant à 6TM. Le senseur de voltage (S4) est en bleu et le pore (intersegment S5-S6) est en vert. KCNE1 est montré comme un cylindre rouge qui représente l'hélice transmembranaire. B. Structure tridimensionnelle du canal. D'après (Horn, Vanoye, and Charles 2012).

MinK régule KvLQT1 en retardant l'ouverture du canal, causant un décalage du seuil d'activation vers des potentiels plus positifs, augmentent la conductance unitaire (et donc la courant globale) et suppriment l'inactivation du canal (Horn et al. 2012) (figure 5, tracés du courant du canal KvLQT1 et KvLQT1 + minK).

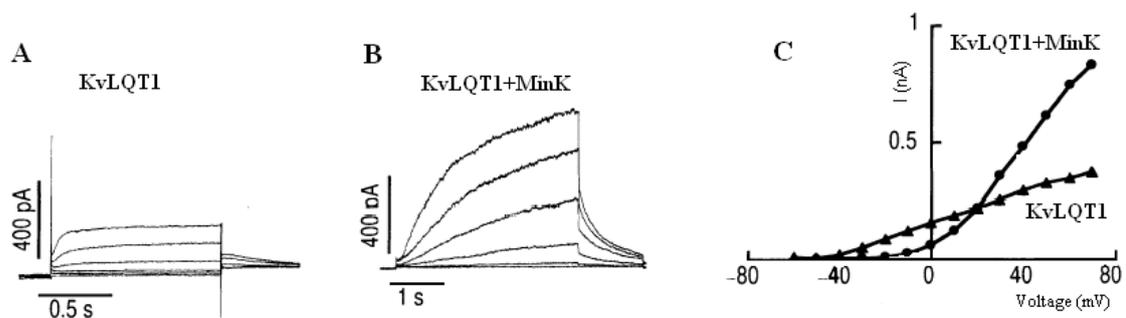


Figure 5 : Expression transitoire de KvLQT1 (A) et KvLQT1+MinK (B) dans les cellules COS.

Courants obtenus en réponse à des créneaux de voltage entre -60 mV et +70 mV qui augmentent de +20 mV à chaque stimulation, et à une repolarisation à -40 mV. Le potentiel de maintien est à -80 mV. C : Courant IKS enregistré à la fin des créneaux de dépolarisation, en fonction du voltage ; il y a une rectification sortante du courant en présence de la sous-unité MinK. Modifié d'après Barhanin et al. 1996.

La stimulation β -adrénergique par la noradrénaline (NA) du système sympathique a un effet chronotrope et inotrope positif sur l'activité cardiaque. Le neurotransmetteur NA active la cascade du signal par la protéine G(s) via la protéine-kinase AMPc-dépendent (PKA). Parmi ses cibles, il y a la régulation de la phase de repolarisation par le courant I_{KS} . Grâce à ce mécanisme de régulation, la stimulation β -adrénergique augmente le courant I_{KS} et accélère donc la phase de repolarisation ventriculaire (Marx et al 2002).

Les mutations qui ont comme conséquence la perte de fonction de KvLQT1 peuvent entraîner le syndrome de QT long de type 1 (LQT1). Celles qui au contraire entraînent un gain de fonction, peuvent entraîner le syndrome de QT court de type 2 (SQT2) (Hedley et al. 2009).

1.1.3 Le courant potassique I_{K1}

A la différence des deux premiers canaux ioniques décrits, ce canal n'a pas d'activité voltage-dépendante importante intrinsèque. Il est codé par le gène KCNJ2 dont le locus est 17q23 et il appartient à la famille des canaux Kir qui sont rectifiants dans le sens entrant (inward rectifier en anglais) (Kubo et al. 2005). Le canal est formé d'un tétramère, dans lequel chaque monomère est constitué d'une protéine à deux segments transmembranaires (2TM). Le canal I_{K1} est constitué d'homo- ou d'hétérotétramère de $K_{ir}2.1$ et $K_{ir}2.2$ (figure 6).

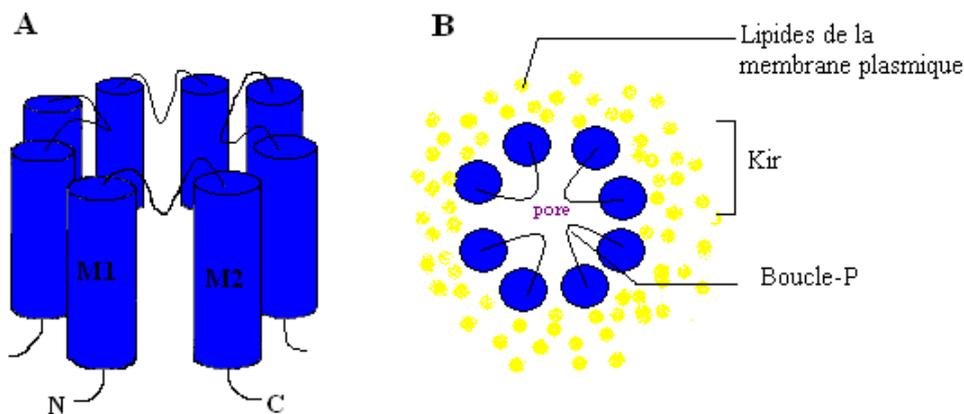


Figure 6 : Schéma du canal responsable du courant potassique cardiaque à rectification entrante, I_{K1} . A) Tétramère qui compose le canal, chaque sous-unité dispose de deux domaines transmembranaires et d'une boucle-P qui forment le canal. B) Vue extracellulaire du canal. Modifié d'après Collins *et al.* 1997.

Ce courant présente une rectification dans le sens entrant suite au blocage par quelques molécules intracellulaires comme tous les K_{ir} . Des expériences de patch-clamp en configuration *inside-out* ont montré que l'absence de magnésium du côté intracellulaire entraîne une relation courant-voltage linéaire pour I_{K1} . La présence de Mg^{2+} à concentration physiologique du côté intracellulaire diminue progressivement le courant sortant porté par ce canal. D'autres molécules, telles que certaines polyamines (la spermine et la spermidine), sont aussi capables de bloquer le canal, ce qui lui confère la caractéristique de rectification dans le sens entrant (Kubo *et al.*, 2005). Il est exprimé dans tous les cardiomyocytes des oreillettes et ventricules. Ce canal est essentiel pour terminer la repolarisation du PA et pour maintenir le potentiel de repos de la cellule en à proximité du potentiel d'équilibre du potassium (E_K) (Roden *et al.* 2002). Sa relation courant – voltage dans le ventricule, montre un maximum de conductance potassique lorsque le potentiel est proche du potentiel de repos de la cellule (et de E_K), puis celle-ci diminue lorsque le potentiel varie entre -60 et -20 mV. On parle de « pente négative » pour décrire cette accentuation de la rectification entrante à ces voltages (figure 7).

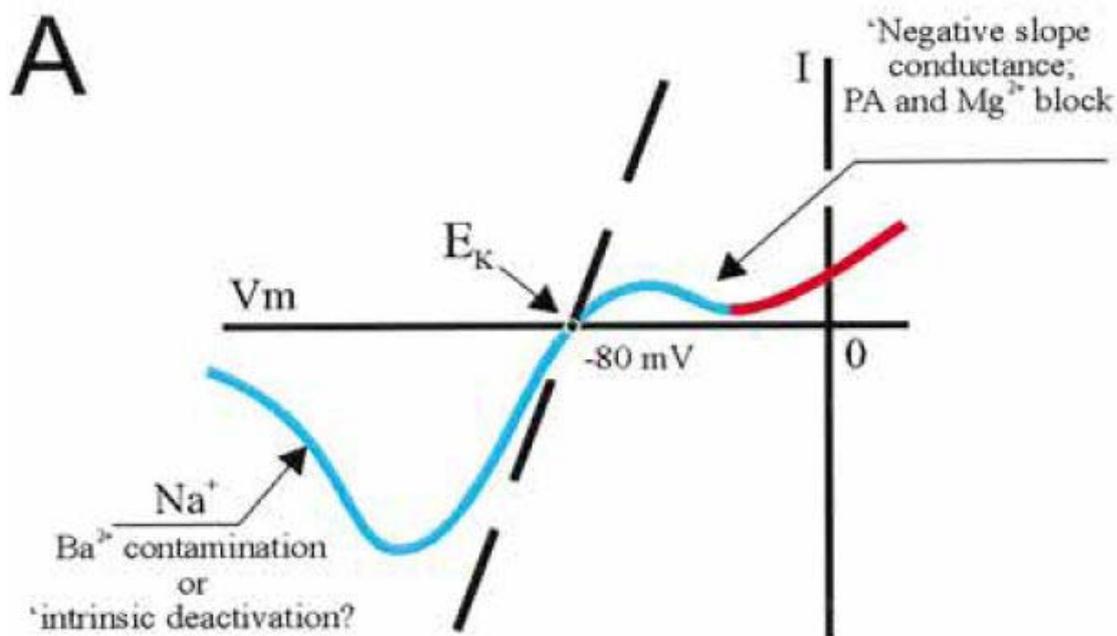


Figure 7. Relation courant – voltage (I-V) de I_{K1} dans un cardiomyocyte de ventricule.

La conductance est plus grande lorsqu'on s'approche du potentiel d'équilibre de K^+ (ligne bleue). Puis elle diminue avec la dépolarisation via un blocage par les polyamines et le Mg^{2+} intracellulaires. Ceci donne une zone de pente négative. D'après (Lopatin and C G Nichols 2001).

Cette propriété de pente négative n'est retrouvée que dans les ventricules. Dans les oreillettes, le canal présente une rectification moins importante à cause de la moindre concentration en polyamines et un effet moins important du blocage par ces molécules, en s'approchant des potentiels positifs (Giles and Imaizumi 1988; Koumi, Backer, and Arentzen 1995).

Les mutations qui ont comme conséquence la perte de fonction de I_{K1} , peuvent entraîner la syndrome de QT long du type 7 (LQT7). Celles qui au contraire, entraînent un gain de fonction du canal, peuvent avoir comme conséquence le syndrome de QT court de type 3 (SQT3) (Hedley et al., 2009).

1.1.4 Le courant calcique I_{CaL}

Les courants calciques les plus importants au niveau du cœur sont ceux de type L (pour «Long Lasting» : qui dure longtemps) et de type T (pour «transient» : transitoire). Dans le PA ventriculaire, on retrouve seulement des canaux de type L, qui entraînent un courant entrant permettant d'obtenir un PA avec un plateau (Roden et al. 2002). Ce canal possède un deuxième effet : le relarguage des stocks calciques réticulaires via les récepteurs à la ryanodine (RyR) du fait de l'entrée de calcium par le canal type L. Dans les cardiomyocytes de ventricule, durant la phase d'excitation de la cellule (dépolérisation), le ion calcium rentre dans la cellule par le canal calcique de type L. Ces ions déclenchent les récepteurs à la ryanodine présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et permettent le relarguage des ion calcium y stockés. Cet mécanisme est appelé « libération de calcium induite par le calcium » (CICR, Calcium Induced - Calcium Release, en anglais). La combinaison de l'entrée par le courant I_{CaL} et le relarguage par le réticulum par les RyR, augmente la concentration de calcium cytoplasmique et permet au Ca^{2+} de se lier à la troponine C dans les myofilaments. L'interaction d'ion calcium avec ces protéines est une étape nécessaire pour la contractions musculaire. Ces processus est appelé couplage excitation – contraction. Ensuite le calcium est expulsé dehors la cellule et rentre au nouveau dans le RS, par la pompe Ca^{2+} -ATPase dans le RS, le transporteur uniport calcique mitochondriale et il est expulsé par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} et la pompe Ca^{2+} -ATPase dans la membrane sarcoplasmique (figure 8) (Bers 2002).

Il existe plusieurs isoformes du récepteur à la ryanodine. La forme retrouvée dans le muscle cardiaque est celle du type 2 (Ryr2). Toute mutation des protéines concernées dans le mécanisme de couplage – contraction (y compris le canal Cav1.2 et Ryr2) peuvent engendrer une arythmie ventriculaire (Vanetucci et al 2012).

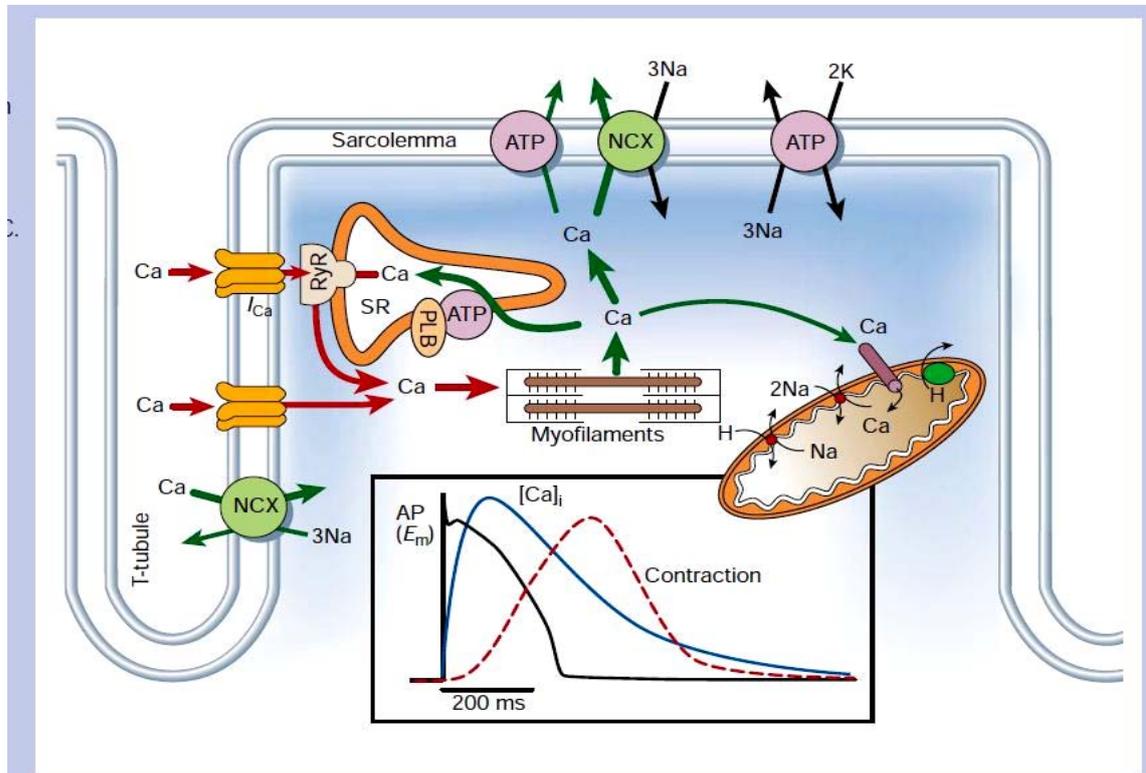


Figure 8. Transport du canal Ca^{2+} dans le myocyte cardiaque.

Le schéma (en bas) montre l'évolution en fonction du temps pendant un PA : du voltage membranaire, du transient calcique et de la mesure de la contraction dans un cardiomyocyte ventriculaire de lapin à 37°C. NCX = échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; PLB = phospholambane ; SR = réticulum sarcoplasmique D'après Bers 2002.

Le canal est de type voltage-dépendant, possédant quatre domaines constitués 6TM chacun. La sous-unité principale du canal calcique de type L, le $\text{Ca}_v1.2$, est également appelée $\alpha 1\text{C}$. L'isoforme cardiaque est la $\alpha 1\text{C-a}$, celle pulmonaire est la $\alpha 1\text{C-b}$ mais elles ont comme origine le même gène, la différence de ces protéines est conséquence de différentes modifications post-transcriptionnels (Welling et al., 1997). Cette sous-unité s'assemble avec une sous-unité β_2 intracellulaire. L'interaction de ces protéines augmente l'amplitude du courant calcique, et accélère l'activation ainsi que l'inactivation, puis décale le seuil d'activation vers potentiels plus hyperpolarisés. Il existe aussi une autre sous-unité ($\alpha 2\text{-}\delta$), dont la fonction n'est pas totalement élucidée (figure 9).

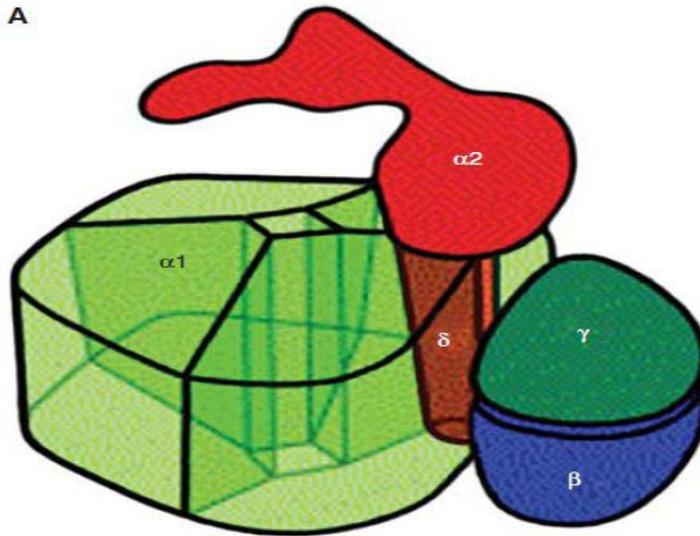


Figure 9 : Structure 3D des canaux ioniques calciques voltage dépendants.

Les sous-unités α_1 , γ et δ sont dans le bicouche lipidique, qui épargne α_2 (extracellulaire) du cytoplasme.

Chacun des quatre intersegments entre S5 à S6 possède un glutamate très conservé, qui confère au canal sa sélectivité au calcium. La présence de plusieurs sites de liaison au calcium dans le pore du canal, mais aussi de sites qui au contraire favorisent la répulsion des ions calciques adjacents entre eux, augmentent le flux calcique au sein du canal lorsqu'il est ouvert. Ce canal est aussi perméable à d'autres ions tel que le zinc ou le cadmium, mais ces ions ont pour effet de le bloquer par effet bouchon. A l'inverse, la perméabilité au baryum est plus élevée que celle au calcium, mais il inactive plus doucement le canal que le calcium. Le courant I_{CaL} présente une inactivation voltage-dépendante et une autre calcium-dépendante, probablement via l'intermédiaire de la calmoduline (Roden et al., 2002).

La stimulation β -adrénergique par la noradrénaline (NA) du système sympathique a un effet chronotrope et inotrope positif sur l'activité du cœur. La NA active la cascade du signal par la protéine G(s) via la protéine-kinase AMPc-dépendant (PKA). Parmi ses cibles, un des plus importants dans le cardiomyocyte est le canal Cav1.2. Pour ce régulation, la protéine Cav1.2 doit s'associer avec à la protéine de ancrage pour la kinase A (A-kinase anchor protein, AKAP). Grâce à ce mécanisme de régulation, la stimulation β -adrénergique peut régler la durée du PA à travers sa phase du plateau (Hell 2010).

Les mutations qui ont comme conséquence la gain de fonction de I_{CaL} , peuvent entrainer la syndrome de QT long du type 8 (LQT8) dit Syndrome de Timothy. Celles qui au contraire, entraînent une perte de fonction du canal (mutation de $Ca_v1.2$ ou β_2), peuvent avoir comme conséquence le syndrome de QT court de type 4 et 5 (SQT4 et SQT5) (Hedley et al., 2009).

Toutes interaction pharmacologique capables de réactiver le canal calcique $Ca_v1.2$ après son inactivation pourraient également déclencher des post-dépolarisations précoces (Early-After-Depolarisation, EAD) (January and Riddle 1989).

1.2 Métabolisme énergétique des acides gras.

La fonction cardiaque repose sur la capacité des cardiomyocytes à convertir différents substrats en énergie. Les principaux substrats des cellules cardiaques sont les acides gras (AG) avec une participation énergétique du glucose habituellement moins importante. Le lactate, le pyruvate, les corps cétoniques et les acides aminés peuvent également être oxydés dans certaines conditions. L'oxydation de ces substrats conduit à la production d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), qui à son tour est oxydé au sein du cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Ce dernier produit un peu d'adénosine triphosphate (ATP) et surtout fournit des équivalents réduits pour la chaîne respiratoire, permettant la synthèse d'ATP au niveau du complexe V. Dans un cœur sain, 60 à 90% de l'ATP produit est issu du catabolisme des AG (W. C. Stanley and Chandler 2002). Il existe un équilibre complexe concernant l'utilisation des différents substrats : en fonction du besoin énergétique et de leur disponibilité. Leur disponibilité relative est le facteur principal pour leur utilisation (Kodde et al. 2007).

1.2.1 Métabolisme des acides gras.

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, le cœur tire l'énergie dont il a besoin principalement via le catabolisme lipidique. Cet organe a une capacité limitée de lipogénèse et de stockage, il doit donc être alimenté en lipides par les artères coronaires de façon quasi continue. Les AG sont présents dans les vaisseaux sous forme estérifiée (mono-, di- et triacylglycérols (TG), phospholipides et esters de lipides) et non estérifiée (AG libres). Les formes les plus utilisées par le cœur sont les AG libres liés à l'albumine et les TG (Kodde et al., 2006). En fonction de la longueur de la chaîne carbonée, on différencie les AG à chaîne courte (AGCC, moins de 8 atomes de carbone), AG à chaîne moyenne (AGCM, entre 8 et 12 atomes de carbone) et AG à chaîne longue (AGCL, entre 14 et 20 atomes de carbone). Chez l'être humain, l'alimentation habituelle fournit presque exclusivement des AGCL, en dehors de la noix de coco qui est riche en AGCM. Les lipides stockés dans l'organisme sont donc des AGCL, qui sont les formes les plus abondantes dans le sang. Ils circulent dans le sang sous

forme de TG contenus dans les lipoprotéines et sous forme d'AG libres couplés avec l'albumine.

Afin d'être utilisés, les AG doivent d'abord être libérés par coupure de liaisons de l'albumine, ou par hydrolyse des AG estérifiés par l'action de la lipoprotéine lipase dans les vaisseaux et des TG tissulaire via l'activité de la triacylglycérol-lipase dans le cytoplasme. Le mécanisme de transport des AG par les cellules n'est pas encore totalement élucidé. A priori, les AG pourraient rentrer dans la cellule par 3 voies : (i) diffusion passive, (ii) diffusion médiée par le récepteur à l'albumine et (iii) par des transporteurs spécifiques, dont le principale est la translocase FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase, FAT, chez le rat qui est homologue de la protéine humaine CD36), dont le fonctionnement est couplé à celui d'une protéine membranaire porteuse des AG (Plasmalemmal Fatty Acid Binding Protein, FABPpm). Une fois que l'AG est rentré dans le cytoplasme, il est activé en acyl-CoA grâce à l'acyl-CoA synthase (ACS). L'acyl-CoA cytoplasmique a plusieurs destins possibles : soit être stocké sous forme de lipides endogènes (TG et phospholipides), soit être oxydé dans la mitochondrie pour la production d'énergie (figure 10).

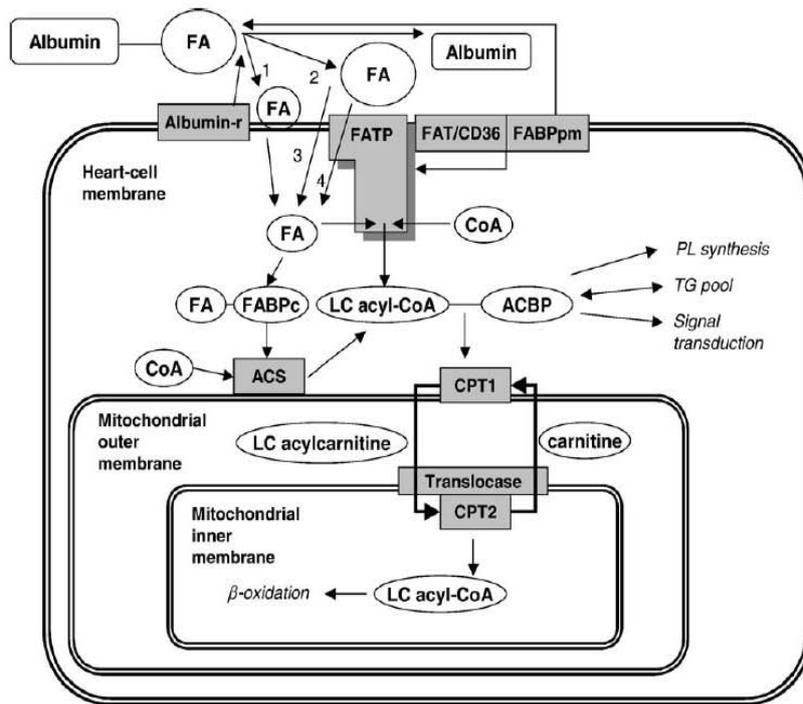


Figure 10. Schéma des voies d'entrée des AG dans la cellule et de leur β -oxydation dans la mitochondrie au niveau cardiaque.

(1) voie d'entrée directe des acides gras dans la membrane. (2) et (3): voie d'entrée indirecte par libération de l'AG libre à proximité de la membrane (2) et diffusion passive (3). (4) Transport de AG par le système de transport des AG (FATP). ACBP = Acyl-CoA Binding Protein. ACS = Acyl-CoA syntase. Albumin-r = récepteur à l'albumine. FA = acide gras. FABPc = fatty acid binding protein. FAT/CD36 = acide gras translocase avec antigène CD36. FATP = protéine de transport des acides gras. D'après Kodde et al., 2006.

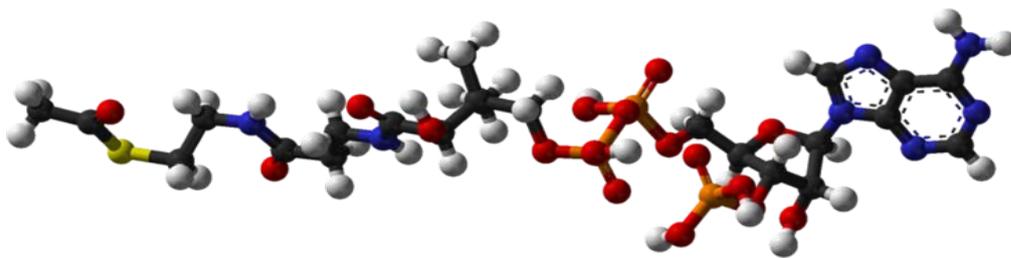


Figure 11. Structure 3D de l'acetyl-CoA.

En noir les atomes de carbones, en bleu d'azotes, en rouge d'oxygènes, en jaunes de sulfure, en blanc d'hydrogène. D'après <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Acetyl-CoA-3D-balls.png>

La membrane mitochondriale, tout comme la membrane cellulaire, est imperméable aux acyl-CoA (figure 10). Le passage des acyl-CoA dans le mitochondrie nécessite l'utilisation d'un système de protéines de transport. Ce système permet de transporter les acyl-CoA dans la mitochondrie, tout en conservant des pools cytoplasmiques et mitochondriaux de CoA libre, et est l'étape régulatrice principale de la β -oxydation des AGCL. Ce système comprend quatre protéines, dont deux de transport. La carnitine palmitoyl-transférase I (CPT I) permet de remplacer le CoA par une molécule de carnitine, aboutissant à la synthèse d'acyl-carnitine (AC). Pour cette étape la CPT I a besoin de carnitine libre cytosolique, dont la concentration suffisante est assurée par un transporteur plasmique de la carnitine (OCTN2). L'AC ainsi synthétisée diffuse librement à travers les membranes mitochondriales jusqu'à le CPT II intramitochondriale. Une protéine de transport située dans l'espace transmembranaire (Carnitine Acyl-Carnitine Transférase, CACT) facilite les échanges de la carnitine libre et des AC entre CPT I et CPT II. La CPT II prend alors en charge l'AC à l'intérieur de la mitochondrie et le convertit à nouveau en acyl-CoA et carnitine libre. Ce processus est régulé par l'activité de la Kinase Activée par l'AMP (AMPK). En condition d'hypoxie ou de stress métabolique, le rapport ATP/AMP diminue et l'AMPK active la voie de β -oxydation. Le CPT I, étape régulatrice principale de β -oxydation des AGCL, est inhibé par le malonil-CoA cytosolique, provenant principalement de l'oxydation des glucides (Kodde *et al.*, 2006).

Un fois l'AG activé sous forme d'acyl-CoA à l'intérieur de la mitochondrie, il est β -oxydé, avec perte de deux atomes de carbone sous forme de acetyl-CoA à chaque tour de β -oxydation, avec production d'énergie. A chaque tour β -oxydation, quatre réactions enzymatiques successives sont nécessaires pour aboutir à la synthèse d'une molécule d'acetyl-CoA. Ces différentes enzymes sont successivement une acyl-CoA déshydrogénase, une enoyl-CoA hydratase, une hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et une thiolase. Il existe des formes spécifiques de ces enzymes en fonction de la longueur de la chaîne carbonée à oxyder. Par exemple, pour les acyl-CoA déshydrogénases, il existe une enzyme pour les AGCC (SCAD), une pour les moyennes AGCM (MCAD), une pour les longues AGCL (LCAD) ou à très longue (VLCAD) (R. J. Wanders et al. 1999).

La β -oxydation des AG insaturés nécessite la mise en œuvre d'autres enzymes auxiliaires (Wanders et al., 1999) L'oxydation mitochondriale des AGCM et des AGCC suit la même voie métabolique, à la différence près que le transport au niveau des membranes plasmiques et mitochondriales se fait par diffusion passive. L'acétyl-CoA et les acyl-CoA de différentes

longueurs de chaîne sont maintenus en équilibre avec leurs dérivés AC correspondants, via l'activité de différentes carnitine-acyltransférases (Jogl, Hsiao, and Tong 2004; Ramsay and Zammit 2004). Les AC diffusant de manière passive au travers des membranes mitochondriales et plasmiques, leur concentration dans le sang est donc le reflet du métabolisme mitochondrial des AG.

1.2.2 Concentration physiologique de la carnitine et de ses dérivés.

La carnitine totale (libre + estérifiée) circulante dans le sang est à la concentration physiologique de $45 \pm 10 \mu\text{M}$. La carnitine libre a une concentration de $30 - 40 \pm 8 \mu\text{M}$, alors que la forme estérifiée (AC) est à une concentration comprise entre 7 et $11 \mu\text{M}$ (Cavedon et al. 2005; Jones et al. 2005; Opalka et al. 2001). Les deux formes sont légèrement plus abondantes chez les hommes (Opalka et al., 2001). La concentration des SCAC et des MCAC physiologique est inférieure à $0.5 \mu\text{M}$. Par contre, les LCAC ont une concentration plus élevée : notamment le C16-CAR ($1 - 4.6 \mu\text{M}$) et le C18 :1-CAR ($1.4 - 2.5 \mu\text{M}$) (Cavedon et al. 2005; Osorio 2007).

1.2.3. Métabolisme de la carnitine.

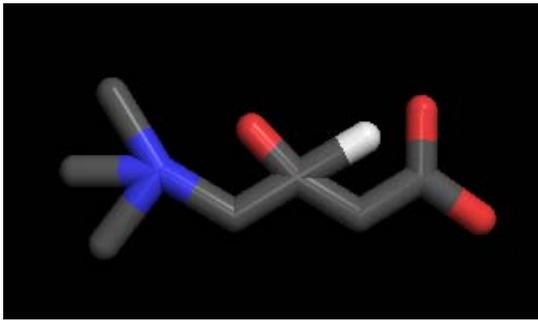


Figure 12. Structure 3D de la carnitine.

En noir les atomes de carbones, en bleu de azote, en rouge de oxygene, en blanc de hydrogène.

D'après

http://molecules.gnu-darwin.org/html/00150001_00175000/154219/154219.png

La carnitine (acide β -hydroxy- γ -triméthylaminobutyrique) (figure 12) est une molécule hydrophile malgré sa neutralité du fait que ce soit un zwitterion. Elle présente donc une charge nette positive et une charge nette négative. L'alimentation ainsi que la synthèse endogène à partir de la triméthyl-lysine constituent deux sources possibles de carnitine. Le facteur limitant pour la production de carnitine endogène est la production de lysine méthylée.

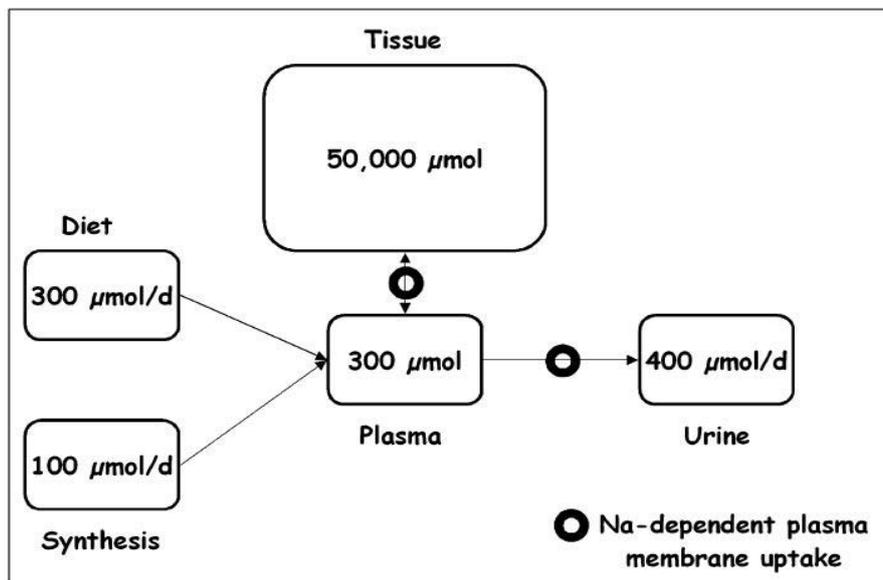


Figure 13. Réserves de carnitine dans le corps et turn-over lié à l'alimentation, la synthèse et l'excrétion urinaire par jour. D'après Stanley, 2004.

La source principale est l'alimentation, en particulier la viande ou le lait. Plus du 99% de la carnitine dans le corps est intracellulaire. La concentration tissulaire est élevée : 2-3 mmol/kg dans le muscle et 800-1500 mmol/kg dans le foie. La carnitine plasmatique ne constitue que 0.5% de la carnitine totale, sa concentration est de 40-60 μ M (figure 13).

La carnitine n'est pas dégradée, mais elle est excrétée *via* l'urine. Au cours du turnover de la carnitine, celle perdue dans l'urine chaque jour, est alors remplacée par celle produite de manière endogène principalement au niveau hépatique et par celle issue de l'alimentation. En condition normale, le régime couvre environ 75% du besoin en carnitine. En condition d'apport faible par l'alimentation (par exemple dans les régimes végétaliens), le *pool* de carnitine ne serait pas affecté. En effet, la synthèse endogène et la réabsorption rénale augmenteraient de manière à compenser le manque d'apport exogène en carnitine (C. a Stanley 2004). Dans ce cas la synthèse endogène peut procurer jusqu'à 90% de la carnitine disponible dans les tissus (Tein 2003).

L'acteur le plus important permettant de contrôler la quantité de carnitine dans le corps est le transporteur membranaire dépendant du sodium. Cette protéine, dite Organic Cation Transporter type 2 (OCTN2), est codé par le gène SCL22A5. On la retrouve dans la membrane plasmique du foie, de l'intestin, des reins et des muscles. Ce transporteur permet de concentrer la carnitine dans ces tissus et favorise donc la β -oxydation des AGCL. Ainsi, au niveau rénal l'OCTN2 évite la perte de la carnitine dans les urines, et permet de maintenir la concentration plasmatique autour de 40-50 mM. En condition physiologique, 90% de la carnitine filtrée est récupérée par les reins. Dans les tissus comme le foie ou le muscle, la concentration intracellulaire de carnitine est 20-50 fois plus importante que la concentration sanguine grâce au transporteur OCTN2 (Stanley, 2004 ; Tein, 2003)

1.3 Lien entre acides gras et canaux ioniques.

Les AG sont le principal substrat énergétique du cœur et ont clairement des effets sur la fonction cardiaque et le développement des maladies cardiovasculaires (Baum 2012; W. C. Stanley, Recchia, and Gary D Lopaschuk 2005; Taegtmeyer and Ballal 2006). Au delà de leur contribution énergétique, les AG jouent également un rôle majeur sur la fonction cardiaque par leur intégration dans les phospholipides membranaires, leur rôle de molécule signal ou de ligand pour certains récepteurs nucléaires (W. C. Stanley et al. 2012). Depuis des dizaines d'années, plusieurs études ont montré que les AG ou leurs dérivés (acyl-CoA ou AC). ont un impact direct sur les canaux ioniques (cardiaques ou non) *in vitro* et sur l'activité du cœur *in vivo*.

1.3.1 Effets des acides gras et de leurs dérivés sur les canaux ioniques cardiaques.

Il a été démontré que certains AG peuvent réguler certains canaux ioniques. Par exemple, l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 :5 n-3), inhibe de façon dose-dépendante le canal ionique cardiaque $Na_v1.5$. A la concentration de 5 μM ce canal est inhibé de 50%, et lorsqu'il est utilisé à la concentration de 10 μM , l'inhibition devient plus importante (64%). Cet effet a lieu après deux minutes de perfusion. Des résultats comparables ont été obtenus avec un autre acide gras poly-insaturé (AGPI), l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22 :6 n-3). Par contre, la même expérience réalisée avec un autre AGPI, l'acide arachidonique (AA, C20 :4 n-6), entraîne une inhibition significative du canal mais beaucoup moins importante (9%) (Xiao *et al.*, 1995). Comme le canal sodique $Na_v1.5$, le canal hERG peut être bloqué par les AGPI. Guizy et collègues (2005) ont montré que l'AA et le DHA inhibent le canal hERG exprimé de façon stable dans la lignée cellulaire Chinese Hamster Ovary cell (CHO), avec un effet plus important de l'AG possédant la plus longue chaîne carbonée : le DHA. A la concentration de 10 μM , l'AA bloque le canal de 37%, et le DHA de 50%. Ces deux AG ouvrent aussi le courant de fenêtre, avec un effet plus important du DHA. Ils ont également mesuré des effets sur la cinétique : accélération de la cinétique de désactivation et décélération de la cinétique d'inactivation (Guizy et al. 2005). Danthi et al. ont montré que les

AG n-3 peuvent également inhiber le canal calcique de type T, avec une puissance différente en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. L' IC_{50} du DHA est de 2,4 μM , celle de l'EPA de 6,1 μM , et celle de l'acide α -linoléique (C18 :3 n-3) de 14,4 μM . C'est-à-dire que l'efficacité de l'inhibition augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. Le DHA régule également la cinétique du canal calcique de type T : il accélère la réactivation à partir de l'état inactivé mais ne change pas la cinétique d'activation ou de désactivation (Danthi, J. a Enyeart, and J. J. Enyeart 2005). Bendahhou et al. ont mesuré l'effet des plusieurs AG à différent longueur de la chaîne carbonée sur le courant I_{to} , le courant I_{K1} et le canal $Na_v1.5$. L'AA et l'acide oléique diminuent la conductance unitaire du canal sodique et ils déplacent la courbe de inactivation vers des potentiels plus négatives. L'acide palmitique (C16) par contre n'a montré aucun effet sur ce canal. Les autours suggèrent donc que l'effets obtenus par l'AA et le C18 ne sont pas secondaires à changement de la fluidité membranaire mais l'effet serait spécifique de l'AG sur le canal et il a besoin de une longueur de la chaine carbonée assez importante (Bendahhou et al., 1997).

Ces effets ne se limitent pas à un effet direct des AG sur les différents canaux ioniques, mais pourraient également être dus à un effet de leurs dérivés, les acyl-CoA ou les AC. Ainsi, Shumilina et collègues ont testé l'effet sur les canaux K_{ATP} ($K_{ir6.2}$) et $K_{ir2.1}$ de l'oleoyl-CoA (C18 :1-CoA) appliqué en intracellulaire dans la lignée cellulaire CHO. Pour les expériences concernant le premier canal, 1 mM d'ATP a été ajouté pour prévenir l'activation du canal. Ils ont montré que le C18-CoA active de façon importante le K_{ATP} et inhibe le canal $K_{ir2.1}$, sans atteindre l'état stable même après 10 minutes d'enregistrement. La perfusion avec l'AG libre correspondant à faible concentration (81 nM) n'a aucun effet sur les deux canaux. Par contre, en présence de concentration de glucose élevée (25 mM), ils ont obtenu une augmentation du courant K_{ATP} ainsi qu'une inhibition du courant $K_{ir2.1}$ (Shumilina et al. 2006). Les auteurs expliquent ce résultat par le fait qu'une concentration élevée en glucose extracellulaire favoriserait l'accumulation intracellulaire d'acyl-CoA à chaîne longue.

Les dérivés AC peuvent également jouer un rôle. Ainsi, Haruna *et al.* (2000) ont montré que le palmitoyl-carnitine (C16-CAR) appliqué en intracellulaire, inhibe le canal K_{ATP} de façon dose-dépendante au moins jusqu'à 10 μM (Haruna et al. 2000). Liu *et al.* ont montré un effet du C16-CAR jusqu'à la concentration de 50 μM sur le courant I_{CaL} isolé à partir de ventricule de porc. Avec des expériences de patch-clamp en canal unitaire sur une bicouche lipidique, ils ont montré que la présence de C16-CAR à 1 μM augmente de huit fois la

probabilité d'ouverture de ce canal. A des concentrations plus élevées, cette augmentation de la probabilité d'ouverture devient moins importante (quatre fois). Si la présence de cette molécule est maintenue, au-delà de un minute d'application, on observe une diminution de l'effet de celle-ci. Il faut également noter, qu'à partir de 10 μM de C16-CAR la conductance unitaire diminue de 26 à 21 pS (Liu et al. 1996). Sato *et al.* (1996) ont montré que la C16-CAR appliqué à des concentrations pathologiques (comprises entre 10 et 50 μM) bloque le courant I_{K1} en diminuant la probabilité d'ouverture (Sato, Arita, and Kiyosue 1993). La même équipe a déjà montré que la C16-CAR à la concentration de 5 μM cause une inhibition partiellement réversible du canal $\text{Na}_v1.5$ en décalant la courbe d'inactivation vers potentiels moins négatifs (Sato, Kiyosue, and Arita 1992).

Plusieurs études ont donc montré une modulation de certains canaux ioniques cardiaques par des AG ou leur dérivés, acyl-CoA et AC. Par contre, dans la plupart des travaux, seul l'effet d'un AG ou de ses dérivés a été testé (habituellement le palmitate, qui est un des AG circulants dont la concentration est la plus importante dans le sang), ce qui limite la comparaison avec des AG ou dérivés de longueurs de chaîne carbonée différentes. De plus, les concentrations utilisées sont souvent élevées (ex : 10 et 50 μM pour les AC), visant à démontrer un effet toxique de ces AG ou de leurs dérivés, sans comparaison avec leurs concentrations physiologiques. Enfin, l'effet sur les courants I_{Kr} et I_{Ks} n'a jamais été étudié, malgré leur importance dans la repolarisation cardiaque.

1.3.2 Troubles du rythme et accumulation en acyl-carnitines.

Ces dernières années, les recherches se sont focalisées sur le rôle potentiellement toxique de l'accumulation des AC dans le cœur et de leur responsabilité dans l'apparition de troubles du rythme. En effet, des troubles du rythme ont été fréquemment rapportés dans certaines situations pathologiques associées à des désordres du métabolisme des AG engendrant une accumulation d'AC. L'accumulation des AC s'explique par un découplage entre leur production et leur utilisation par la β -oxydation et la phosphorylation oxydative, dû soit à un excès de production (par exemple dans le diabète), soit à un défaut d'utilisation (par exemple dans l'ischémie cardiaque, déficit génétique de la β -oxydation,...) et possiblement à l'association de ces deux mécanismes.

Nous allons ici décrire certaines de ces maladies :

1.3.2.1 Infarctus du myocarde.

L'ischémie cardiaque *in vivo* est associée à des fortes perturbations électriques du tissu cardiaque. Ces perturbations se déclenchent quelques minutes après l'arrêt du flux sanguin et sont rapidement réversibles avec la reperfusion. Ceci suggère qu'il existerait des changements biochimiques et/ou électrophysiologiques rapides au niveau de la membrane plasmique (Baker et al. 2005; Corr, Saffitz, and Sobel 1987; Corr and Yamada 1995). Pendant l'ischémie cardiaque, les AG, les AC et autres métabolites hydrophobes augmentent rapidement dans le sang du fait du manque d'oxygène dans la cellule et du blocage de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale. Il a été montré que la concentration de ces molécules augmente au cours et dans les suites immédiates à l'ischémie. En effet, chez les patients ischémiques, le taux d'AG libres dans le sang augmente plus de deux fois par rapport à celui des patients sains (0.96 ± 0.06 mM vs 0.40 ± 0.01 mM) et cette concentration est maintenue élevée pendant les 48h qui suivent l'ischémie (G D Lopaschuk et al. 1994). DaTorre et al. ont montré que les LCAC circulants augmentent de quatre fois au cours de l'infarctus (DaTorre et al. 1991). Ford et al. (1996) ont mesuré la variation de concentration en AC dans le cœur de lapin avant et après cinq et vingt minutes de ischémie par spectrométrie de masse. Après vingt minutes, les SCAC et les MCAC n'était pas changé, sauf que pour un augmentation de 2.7 fois pour le C14 :0-CAR, le MCAC avec le chaîne carbonée plus longue. Par contre toutes les LCAC (de C16 :0-CAR à C20 :4-CAR) étaient sensiblement augmentées, en moyenne de 7 fois. Notamment le C16 :0-CAR et le C18 :1-CAR augmentent de 6.7 et 8 fois respectivement. Cette augmentation était encore plus importante pendant les première cinq minutes (Ford et al. 1996).

Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que la cause des perturbations des propriétés électriques membranaires faisant suite à l'ischémie, étaient due à l'accumulation des AG ou à celle de leurs dérivés tels que le AC ou acyl-CoA à chaîne longue (DaTorre et al. 1991; Hendrickson et al. 1997; G D Lopaschuk et al. 1994). DaTorre et al., grâce à des expériences *in vitro* sur des cardiomyocytes, ont montré que des concentrations élevées de LCAC peuvent induire les même désordres électrophysiologiques que ceux retrouvés *in vivo* pendant l'ischémie cardiaque (DaTorre et al., 1991).

1.3.2.2. Diabète.

Chez les patients atteints de diabète du type II, la mort par maladies cardiovasculaires sont entre deux et quatre fois que chez les personnes sains. La pluparts de ces décès arrive par mort subite par trouble du rythme. Dans le diabète, le métabolisme énergétique cardiaque doit s'adapter aux nouvelles capacités métaboliques afin de maintenir constante la production d'énergie. Dans ces conditions, la consommation de glucose diminue avec l'augmentation la contribution énergétique des AG. Des changements aigus et chroniques du métabolisme cardiaque font partie des causes du développement de cardiomyopathies observées dans le diabète qui ont pour cause principale l'athérosclérose. Ces maladie de la microcirculation est la cause principale de la mort secondaire au diabète, étant donné que le cœur en hypertrophie et avec de athérosclérose de la microcirculation sont des conditions favorables pour le déclenchement des arythmies cardiaque. Par contre une partie de ces arythmies ne sont pas attribuables à l'hypertrophie ou à la microcirculation. Un partie des décès par mort subite semblerait la conséquence des perturbations électriques liées au changement du métabolisme cardiaque (Spooner 2008).

Cependant ces cardiomyopathies se développent assez tardivement, et ne suffisent pas à expliquer la présence de troubles du rythme. Il faut noter qu'une activité cardiaque pathologique est décelable chez les diabétiques avant même que ces signes n'apparaissent (implication des vaisseaux ou augmentation de la tension artérielle). Un lien semble donc envisageable entre le simple changement métabolique et l'activité électrique du cœur (An and Rodrigues 2006).

Feuvray et al. ont mesuré la fonction cardiaque et étudié le métabolisme énergétique de cœurs de rats sains ou diabétiques perfusés *ex vivo* et exposé à une ischémie. Ils ont montré que, pendant l'ischémie, la concentration en acyl-CoA et en AC à chaîne longue augmentent chez les cœurs sains et diabétiques, mais cette augmentation est beaucoup plus importante pour les cœurs de rats diabétiques (Feuvray, Idell-Wenger, and Neely 1979). Ces résultats ont été confirmés par Su et al. (2005) qui ont également validité cette hypothèse chez la souris. Le diabète, s'il n'est pas traité, provoque une augmentation de la concentration des AC de quatre fois dans le sang. De plus, ils ont montré que cette augmentation ne concerne pas tous les AC, mais elle correspond seulement aux LCAC, tels que la palmitoyl-carnitine (C16 :0-CAR), l'oleyl-carnitine (C18 :1-CAR) et le linoleyl-carnitine (C18 :2-CAR). Cette augmentation est partiellement réversible suite à l'administration d'insuline (Su et al. 2005). Ziolo et al. ont

montré que l'augmentation des arythmies chez les diabétiques n'est pas due à un changement de sensibilité des canaux ioniques aux métabolites des AG comme le palmitoyl-carnitine (C16-CAR) ou lysophosphatidylcoline (LPC), au moins pour le canal calcique du type L. La sensibilité ne change pas, donc les perturbations observées au niveau de l'activité électrique des cardiomyocytes des individus diabétiques ou ischémiques seraient plutôt le résultat d'une augmentation des concentrations des LCAC (Ziolo et al. 2001).

1.3.2.3 Déficit génétiques de la β -oxydation des acides gras.

Le métabolisme énergétique des AG fait appel à différents transporteurs cytosolique et mitochondriaux et à de multiples enzymes principalement mitochondriales. Toutes ces étapes (précédemment détaillées dans le chapitre 1.2), peuvent être déficitaires par mutations dans le gène correspondant. Il en résulte un déficit génétique de la β -oxydation des AG, dont la présentation clinique varie en fonction de l'étape déficitaire, mais est souvent sévère (Saudubray et al. 1999). Le premier mécanisme physiopathologique impliqué dans ces maladies est un défaut de production d'énergie à partir des AG, qui se traduit dans la plupart des cas par des hypoglycémies sans cétose favorisées par le jeûne prolongé, le glucose étant alors le seul substrat énergétique utilisable par les différents organes. Cette carence énergétique ne suffit pas à elle seule à expliquer les différents symptômes et leur sévérité, et le rôle de l'accumulation potentiellement toxique des AG et de leurs dérivés a été incriminé. Ainsi, une atteinte cardiaque, sous forme de cardiomyopathie et/ou de troubles du rythme, a été rapportée, mais uniquement dans les déficits associés à une accumulation des AC à chaîne longue (Bonnet et al. 1999). Ainsi, les différentes étapes concernées sont le transport mitochondrial des LCAC (déficit en CACT ou CPT-II), le déficit à proprement parler des enzymes mitochondriales de la β -oxydation des AGCL (déficit en VLCAD, LCHAD et enzyme trifonctionnelle) ou du transport d'électrons correspondant à ces étapes (déficits en ETF, ETF-DH et ACAD9) (Bonnet et al. 1999; Saudubray et al. 1999; Spiekerkoetter 2010). Le mécanisme physiopathologique suspecté pour expliquer les troubles du rythme serait un effet toxique des AC sur les canaux ioniques cardiaques (Bonnet et al., 1999 ; DaTorre 1991). Cet effet toxique semble spécifiquement lié aux LCAC, puisqu'il n'est pas classiquement rapporté de troubles du rythme ou de symptômes cardiaques dans les déficits de β -oxydation des AGCM ou AGCC, situations associées à une accumulation de dérivés des AG de longueur de chaîne correspondante (Bonnet et al. 1999).

1.3.2.4 Toxicité des LCAC ?

L'ensemble de ces situations pathologiques fait suspecter un rôle potentiellement toxique des LCAC sur les canaux ioniques cardiaques. Ainsi, des expériences *in vitro* ont montré que plusieurs LCAC, notamment le C16-CAR et le C18-CAR, sont capables de moduler de façon importante l'activité de plusieurs canaux ioniques cardiaques (voir chapitre 1.3.1). Dans la plupart des cas, les concentrations utilisées correspondent à celles qu'on retrouve dans des maladies pour lesquelles il a été observé une accumulation de ces dérivés dans le sang.

D'autres expériences ont également montré que l'accumulation des LCAC *in vivo* consécutive au développement de plusieurs maladies (infarctus, diabète, maladies génétiques du catabolisme des AG) serait associée à la perturbation de l'activité électrique cardiaque et aux troubles du rythme.

Tous ces éléments mènent à penser que l'accumulation des LCAC *in vivo* pourrait être toxique pour les cardiomyocytes en agissant plus ou moins directement sur l'activité des canaux ioniques cardiaques.

1.3.3 Troubles du rythme et diminution de la concentration en acyl-carnitines.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'accumulation de LCAC était spécifiquement associée à une cardiomyopathie et des troubles du rythme cardiaque. Avant de conclure à un effet toxique des LCAC sur les canaux ioniques cardiaques, il est important de se poser la question de ce qu'il se passe en situation de carence en AC, notamment à chaîne longue. Malheureusement, les situations physiopathologiques associées à une telle carence sont beaucoup plus rares. La carence en carnitine libre, indispensable à la synthèse des AC, est une situation qui se rencontre chez les sujets exposés à un régime végétarien (C. a Stanley 2004). Dans cette situation, il n'existe habituellement pas de symptôme cardiaque, mais ceci est vraisemblablement dû à la présence du transporteur de la carnitine au niveau des cellules cardiaques, qui permet de concentrer la carnitine à l'intérieur des cellules même en cas de faible concentration de carnitine circulante. Il n'a pas non plus été rapporté de symptômes cardiaques dans les déficits de synthèse des LCAC, par déficit génétique en CPT-I (Bonnet et al., 1999 ; Saudubray 1999). Ceci s'explique simplement par le fait que les seuls déficits en

CPT-I rapportés à ce jour chez l'être humain sont un déficit dans l'isoforme hépatique de la CPT-I (CPTI-L), alors que le déficit en isoforme musculaire (CPTI-M) n'a jamais été décrit et est vraisemblablement non viable (Bonfont et al. 1999). Finalement, seul le déficit primaire en carnitine, est responsable d'une carence myocardique profonde en carnitine et donc en AC. Ce modèle de maladie génétique, pour lequel il existe également un modèle animal, permet de comprendre les effets de la carence en carnitine et en AC (Horiuchi et al. 1993; Tein 2003).

1.3.3.1 Déficit Systémique Primaire en Carnitine (PSCD).

Le premier cas répertorié pour cette maladie a été décrit en 1975 par Karpati *et al.* chez un enfant de 11 ans. Le diagnostic alors posé était un déficit systémique en carnitine, mais la cause au niveau moléculaire n'était pas encore élucidée (Karpati et al. 1975). Cette dernière a été comprise quelques années plus tard, comme étant une mutation du gène SLC22A5 dans le locus 5q31.1, engendrant une perte de fonction pour la protéine OCTN2. Cette protéine est un symporteur qui permet de concentrer la carnitine et d'autres molécules dans la cellule, en utilisant l'entrée de sodium selon son gradient électrochimique. Ce transporteur est présent surtout dans la membrane plasmique des cellules du muscle strié, du cœur, des reins, des lymphoblastes et des fibroblastes. Le Déficit Primaire Systémique en Carnitine (Primary Systemic Carnitine Deficiency, PSCD, OMIM #212140) est une maladie récessive autosomique provoquée par une mutation du gène SCL22A5 codant pour la protéine OCTN2. L'incidence est estimée en 1:40 000 au Japon (A. Koizumi et al. 1999) et une incidence comparable est estimée en Europe et aux États-Unis (Longo, Amat di San Filippo, and Pasquali 2006). Physiologiquement, la protéine OCTN2 est exprimée au niveau des muscles et des reins. Dans le muscle, elle permet de concentrer dans le cytoplasme la carnitine provenant du sang, alors que dans les reins cette protéine présente sur le tubule distal, récupère 99% de la carnitine ayant diffusé vers le tubule proximal, contribuant ainsi à maintenir constante la concentration sanguine et la réserve totale dans le corps. La carnitine intracellulaire permet l'entrée des AGCL dans les mitochondries ainsi que leur β -oxydation. Les LCAC peuvent aussi diffuser à travers des membranes mitochondriales et plasmiques, ce qui permet de les retrouver dans le sang (voir paragraphe 1.2.1). Le PSCD a pour conséquence une perte de carnitine via l'excrétion urinaire et une concentration plasmique et intracellulaire de carnitine et de ses dérivés proche de zéro. La concentration en carnitine totale (libre et dérivés) présente une échelle de valeurs comprises entre 0 et 5 μ M, contre 35-

50 μM chez les individus sains. Chez les hétérozygotes la concentration est diminuée de 50% par rapport à celle physiologique mais ils sont asymptomatiques dans la plupart des cas (Longo et al., 2006). Les symptômes du PSCD sont une hypoglycémie de jeûne prolongée, une cardiomyopathie dilatée, avec insuffisance cardiaque et trouble de la repolarisation cardiaque, une faiblesse musculaire, une hépatomégalie, avec hyperammonémie et stéatose hépatique (Longo et al., 2006 ; Stanley, 2004). Cette maladie a également été reliée à la mort subite faisant suite à une fibrillation ventriculaire, surtout chez les enfants et en particulier si elle est associée à d'autres facteurs de risque telles que l'administration de certains antibiotiques (Rasmussen et al. 2012) ou une alimentation végétarienne (Rinaldo et al. 1997). En effet, ces deux dernières situations appauvrissent la réserve en carnitine disponible. Des troubles du rythme cardiaque ont également été rapportés chez des sujets plus âgés (Mazzini et al. 2011; Rijlaarsdam et al. 2004).

1.3.3.2 Rôle régulateur des acyl-carnitines à chaîne longue sur les canaux ioniques cardiaques ?

L'excès d'AC comme leur carence sont associés à une dysfonction myocardique avec un risque élevé de troubles du rythme et de mort subite. Cet effet semble spécifique des LCAC, tout du moins dans la situation où ils sont en excès. Ces constatations suggèrent que la carnitine et ses dérivés, plus spécifiquement les LCAC, pourraient jouer un rôle régulateur et non simplement toxique sur certains canaux ioniques impliqués dans la repolarisation cardiaque. Cette hypothèse permettrait également de faire un lien direct entre le métabolisme énergétique, la concentration cellulaire et plasmatique des AC reflétant l'oxydation des AG, et les canaux ioniques responsables de l'activité électrique et contractile de la cellule. C'est l'hypothèse que nous avons voulu explorer.

2 Objectifs de la thèse

2.1 Démontrer le lien entre acyl-carnitines à chaîne longue et activité électrique cardiaque.

Dans la littérature plusieurs maladies (parmi elles : l'infarctus, le diabète et certaines maladies génétiques) ont été associées à des désordres du métabolisme des AG ainsi qu'à une concentration pathologiquement élevée des AC circulantes. Ces conditions ont été associées à une augmentation du risque de troubles du rythme et mort subite. Certaines maladies comme le diabète ou l'infarctus du myocarde sont aussi cause de cardiomyopathie, qui favorise les perturbations électriques bien qu'elle n'en soit pas la seule cause. L'hypothèse est que le changement du métabolisme que on retrouve dans ces maladies (voir paragraphe 1.3.2 dans l'Introduction), puisse participer aux perturbations électriques mesurés. Il se pourrait également qu'il existe une association entre concentration élevée en AC et des perturbations de l'activité électrique cardiaque. Mais cette hypothèse n'a jamais été clairement démontrée.

Dans plusieurs études sur l'implication possible des AC dans la genèse du trouble du rythme, on distingue les LCAC des MCAC pour lesquels il n'a jamais été démontré d'association au troubles du rythme. Ceci sous-entend un effet direct et spécifique des LCAC plutôt que des MCAC ou de la CAR libre, sur les canaux ioniques cardiaques. A l'inverse, des troubles du rythme ont récemment été décrits dans le syndrome de Déficit Primaire Systémique en Carnitine (PSCD). Ce syndrome a pour conséquence une chute de la concentration des LCAC, ce qui peut aussi entraîner des perturbations électriques. L'hypothèse d'un lien entre la concentration en LCAC et activité électrique cardiaque ne se limite donc pas à une augmentation de cette concentration. En effet, toute perturbation du taux physiologique de LCAC, augmentation ou diminution de celui-ci, peut engendrer des troubles du rythme. Il existerait donc une concentration physiologique de LCAC qui permettrait le fonctionnement normal d'un ou plusieurs canaux cardiaques, et toutes les concentrations qui s'éloigneraient de cette condition physiologique perturberaient l'activité électrique.

Plusieurs équipes ont montré que certains LCAC, en particulier la palmitoyl-carnitine (C16-CAR), modulent certains canaux ioniques cardiaques. Mais ces expériences ont toujours été réalisées en comparant l'effet d'une concentration élevée *versus* l'absence de LCAC. Or, ces deux concentrations sont pathologiques et ces études ne renseignent pas sur l'effet de la

concentration physiologique. De plus, dans chacune des ces études, seul un type d'AC a été testé, ce qui ne donne aucune information sur l'éventuelle spécificité de l'effet.

Le but de notre étude sera donc d'étudier l'effet de plusieurs AC possédant différentes longueurs de la chaîne carbonée sur plusieurs canaux ioniques cardiaques. Différentes concentrations seront testées : deux élevées et deux basses, qui seront comparées à la concentration physiologique de référence. La spécificité du site d'action (extracellulaire ou intracellulaire) des LCAC sera également étudiée.

La technique utilisée sera le patch-clamp, afin d'étudier les courants présents dans la lignée cellulaire HEK293 ainsi que dans des cellules natives de cardiomyocytes de rat.

2.2 Choix des molécules testées sur les canaux ioniques.

Le but de cette étude a été de vérifier l'éventuelle spécificité de l'effet des AC en fonction de la longueur de la chaîne. Pour cela nous ont utilisé trois classes de dérivés des AG : deux MCAC, deux LCAC, ainsi que la carnitine libre. Les molécules utilisées étaient donc :

- Carnitine libre (CAR)
- Octanoyl-carnitine (C8-CAR)
- Decanoyl-carnitine (C10-CAR)
- Palmitoyl-carnitine (C16 :0-CAR)
- Oleoyl-carnitine (C18 :1-CAR)

Le but a été principalement d'étudier l'effet de ces molécules à des concentrations physiologiques *versus* concentration basses ou élevées. Les concentrations utilisées seront 0, 1, 3 (concentration physiologique de référence), 10 et 30 μM . Pour préciser la spécificité de l'effet retrouvé, nous avons répété ces expériences avec l'AG correspondant à l'AC déjà utilisée, mais sans le groupement chargé de la carnitine. Ceci permet de comprendre si l'effet observé de la LCAC est le résultat de l'augmentation de la fluidité membranaire ou s'il s'agit d'un effet plus spécifique sur la protéine canal.

Dans le métabolisme des AG et de la CAR, avec les AC et les AG, il y a aussi la production des acyl-CoA (voir paragraphe 1.2.1 dans l'introduction). Nous avons décidé de ne pas tester l'effet de ces molécules sur les canaux ioniques cardiaques. D'abord en littérature il y a moins d'articles qui font penser que ces molécules peuvent réguler les canaux. Et surtout, à différence des AG et des AC, les la membrane mitochondriale et celle cellulaire sont imperméables aux acyl-CoA (Tein 2003), ils sont donc présents dans les cellules et leur concentration peut changer selon l'état métabolique de la cellule, mais ils sont absents dans le sang. Pour ceci, tester leur effet en extracellulaire sur les canaux ioniques aurait eu un intérêt mineur par rapport aux AG et aux AC.

2.3 Choix des canaux ioniques testés.

Nous nous sommes intéressés aux protéines cardiaques capables de réguler l'activité électrique cardiaque : les canaux ioniques. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné les canaux ioniques qui, lorsqu'ils sont porteurs de certaines mutations, sont responsables du syndrome de QT court. Ce dernier a pour conséquence des troubles du rythme liés à des perturbations électriques. Les protéines testées ont donc été :

1. Kv11.1 (canal hERG), qui avec les sous-unités minK et MiRP1 donne le courant I_{Kr}
2. Kv7.1, qui avec la sous-unité MiRP2 donne le courant I_{Ks}
3. Kir2.1 qui donne le courant I_{K1}
4. Cav1.2 qui avec les sous-unités β_{2a} et $\alpha_{2\delta}$ donne le courant I_{CaL}
5. I_{CaL} dans les cardiomyocytes du rat

Ces quatre canaux ioniques ont été montrés comme peuvent être impliqués dans le syndrome de QT court, quand ils sont porteurs de certaines mutations. Avec le $Na_v1.5$, ils sont les canaux ioniques impliqués dans le syndrome de QT long (Hedley et al., 2008). Toute modification de l'activité électrique de ces canaux (mutation pathologique et/ou modification des conditions environnementales) peut entraîner des ECG anormaux pouvant aller jusqu'à des troubles du rythme.

3 Publication. “Long Chain Acyl-carnitines regulate the hERG channel”. Ferro et al.,
PLOS ONE, 2012

Long-Chain Acylcarnitines Regulate the hERG Channel

Fabio Ferro^{1,3}, Aude Ouillé^{2,4,5}, Truong-An Tran¹, Pierre Fontanaud³, Patrick Bois⁴, Dominique Babuty⁵, François Labarthe¹, Jean-Yves Le Guennec²

1 INSERM U921, Université François-Rabelais, Tours, France, **2** INSERM U1046, Université Montpellier-1, Université Montpellier-2, Montpellier, France, **3** IGF-CNRS INSERM 661, Université Montpellier-1, Université Montpellier-2, Montpellier, France, **4** IPBC, UMR 6187, CNRS, Université de Poitiers, Poitiers, France, **5** CHRU Tours, Hôpital Trousseau, Service de cardiologie B, Tours, France

Abstract

Background and purpose: In some pathological conditions carnitine concentration is high while in others it is low. In both cases, cardiac arrhythmias can occur and lead to sudden cardiac death. It has been proposed that in ischaemia, acylcarnitine (acyl-CAR), but not carnitine, is involved in arrhythmias through modulation of ionic currents. We studied the effects of acyl-CARs on hERG, $K_{IR2.1}$ and $K_{v7.1/minK}$ channels (channels responsible for I_{KIR} , I_{K1} and I_{KS} respectively).

Experimental approach: HEK293 cells stably expressing hERG, $K_{IR2.1}$ or $K_{v7.1/minK}$ were studied using the patch clamp technique. Free carnitine (CAR) and acyl-CAR derivatives of medium- (C8 and C10) and long-chain (C16 and C18:1) fatty acids were applied intra- and extracellularly at different concentrations. For studies on hERG, C16 and C18:1 free fatty acid were also used.

Key results: Extracellular long-chain (LCAC), but not medium-chain, acyl-CAR induced an increase of I_{HERG} amplitude associated with a dose-dependent speeding of deactivation kinetics. They had no effect on $K_{IR2.1}$ or $K_{v7.1/minK}$ currents. Computer simulations of these effects were consistent with changes in action potential profile.

Conclusions and applications: Extracellular LCAC tonically regulates I_{HERG} amplitude and kinetics under physiological conditions. This modulation may contribute to the changes in action potential duration that precede cardiac arrhythmias in ischaemia, diabetes and primary systemic carnitine deficiency.

Citation: Ferro F, Ouillé A, Tran T-A, Fontanaud P, Bois P, et al. (2012) Long-Chain Acylcarnitines Regulate the hERG Channel. PLoS ONE 7(7): e41686. doi:10.1371/journal.pone.0041686

Editor: Alexander G. Obukhov, Indiana University School of Medicine, United States of America

Received: January 30, 2012; **Accepted:** June 25, 2012; **Published:** July 25, 2012

Copyright: © 2012 Ferro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financially supported by Boston Scientific and the conseil Régional du Centre. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the Journal's policy and have the following conflicts: They have received funding from Boston Scientific. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: aude.ouille@inserm.fr

† These authors contributed equally to the work.

Introduction

Fatty acids are the primary substrate used by the heart to generate ATP [1]. The initial steps involved in ATP production via β -oxidation include the formation of essential intermediates that facilitate the transport of fatty acids into the mitochondrial matrix where the β -oxidation enzymes are located. More specifically, after their entry into the cell, fatty acids are activated in the cytosol via the formation of acyl-CoA derivatives, which are either incorporated into intracellular lipid pools or enter mitochondria for β -oxidation. Carnitine (CAR) is the essential co-factor needed for mitochondrial fatty acid oxidation. It operates by shuttling long-chain fatty acids as acylcarnitine esters (acyl-CAR) from the cytoplasm across the inner mitochondrial membrane into the mitochondrial matrix. After their entry into the mitochondria, long-chain acyl-CAR (LCAC) are converted back to long-chain acyl-CoA esters, which are then β -oxidized into acyl-CoA of progressively shorter chain lengths (i.e. long-, medium-, short-chain acyl-CoA, and ultimately acetyl-CoA). Free carnitine is then recycled [2]. In contrast to acyl-CoA, acyl-CARs diffuse easily through the mitochondrial and plasma membranes.

Thus their blood concentration reflects the fluxes of various mitochondrial β -oxidation steps. This process is also suspected to be protective against the accumulation of potentially toxic acyl-CoA derivatives in mitochondria and to preserve free CoA availability for energy metabolism [3].

In normal myocardium, the concentration of acyl-CARs is low, around 2–3 μ M, because the transformation of cytosolic acyl-CoA into acyl-CAR is tightly coupled to myocardial energy demand [4–6]. Acyl-CARs are synthesized in the cell and they can easily diffuse through the cell membrane and reach the cytosol.

Free fatty acid and acyl-CAR concentrations can increase in some pathological conditions such as myocardial ischaemia [7], diabetes [8], [9] and genetic fatty acid disorders [10]. The arrhythmias observed in these conditions could be due to a perturbation of cardiomyocyte repolarisation by carnitine or its derivatives.

In pathological conditions such as primary systemic carnitine deficiency or ischaemia, acyl-CARs can either decrease to immeasurably low levels [2] or increase to 30 μ M [11] respectively. It has been found that long chain acyl-CARs

modulate the activity of certain calcium and sodium channels at a concentration of 5–10 μM [12–13]. However, the effects of acyl-CARs on outward currents participating in repolarization (hERG, Kv7.1/minK and KIR2.1 channels) have not been studied. Changes in the activity of these potassium channels are known to be associated with ventricular fibrillation and sudden death [14–15]. These arrhythmias could be either due to K^+ channel blockade, by drugs or loss-of-function by mutations (long QT syndrome), or due to their activation by hyperkalemia, acidosis, digitalis toxicity, hyperthermia [16], or gain-of-function mutations [17].

The purpose of this study was to evaluate the effects of different concentrations of medium- and long-chain acyl-CARs on these repolarizing potassium channels. A physiological concentration of 3 μM acyl-CAR [5–6], [18], was compared to very low and high acyl-CAR concentrations, applied either intra- or extracellularly.

Methods

Cell Culture

HEK293 cells expressing Kv11.1 (hERG channel) were a kind gift from Drs Zhou and January (Madison, USA) [19]. HEK293(LGC Promochem, France) expressing $\text{K}_v7.1$ associated with minK subunit (*KCNK1* gene) and KIR2.1 channel (*KCNK2* gene, I_{K1}) were made inhouse. Cells were seeded in 25 cm^2 cell-culture flasks at 37°C and 10% CO_2 and grown in DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium). HEK-hERG medium was supplemented with 0.4 mg/ml geneticin (Gibco, Invitrogen Corporation, UK). Culture medium was changed every 2–3 days. Within 7 days, cells were at approximately 80% of confluence. The cells were then harvested using a Dulbecco Phosphate Buffered Saline without calcium and magnesium (DPBS, Cambrex Bio Science Verviers, Belgium) and trypsin (Lonza, Belgium) and seeded in a new culture flask (60000 cells/flask) for following week. Cells were also seeded in 35 mm Petri dishes to obtain a confluence of about 50% on the day of experimentation. Cells were mycoplasma negative.

Whole-cell patch-clamp Recording

Cells were placed on the stage of an inverted microscope (Nikon TE2000-U, Japan). Patch-clamp techniques have been described in detail elsewhere [20]. Currents were recorded by whole-cell voltage clamp with a Biologic RK-400 amplifier (Biologic, Grenoble, France) and an Axopatch 200 B (Axon Instrument, La Jolla, USA). Currents were filtered at 3 kHz (Axopatch) or 2 kHz (Biologic) and sampled at 5 kHz. Borosilicate glass electrodes (GC150F-15, Harvard Apparatus, UK) with tip resistances of 3.5–5 $\text{M}\Omega$ when filled with the internal solution for I_{KR} and I_{K1} channel. This solution contained (in mM): KCl 130, MgCl_2 1, Mg-ATP 5, EGTA 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.2 with KOH. The internal solution for studying I_{KS} was (in mM): KCl 130, MgCl_2 1, NaCl 10, CaCl_2 1, HEPES 5, adjusted to pH 7.2 with KOH. The external physiological saline solution (PSS) contained (in mM): NaCl 137, KCl 4, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, D-Glucose 10, and HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. For HEK- I_{KS} experiments we used the perforated-patch configuration which was obtained with 0.250 mg/ml nystatin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Experiments were conducted at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Junction potentials were zeroed before formation of the membrane-pipette seal. Series resistance and capacitance were compensated. Current amplitudes were normalized to cell capacitance and expressed as current density (pA/pF). Cell capacitance ranged between 10 to 20 pF. The cell under study

was positioned at the tip of a conical microcapillary that received the outlet of six microcapillaries connected to 10 ml syringes. Superfusion was gravity-driven at 0.4 ml/min.

hERG protocols. Cells were held at a membrane potential of -70 mV. After control data were obtained, the superfusion was switched to the chosen acyl-CAR-containing solution, fatty-acid-containing solution, or E4031-containing solution. Currents were elicited by 5 s test pulses to -10 mV applied every 18 s until steady-state was obtained. Steady-state current voltage relationships (IV) were obtained by stepping the membrane voltage for 5 s to voltages between -80 and $+50$ mV by 10 mV increments. Deactivating tail currents were recorded at -55 mV. The activation curves were obtained from the tail current amplitude measured at its peak value. The availability curves were obtained from the maximum current amplitude measured at a test pulse to $+40$ mV, applied after a two-pulse protocol that consisted of a 1 s depolarizing pulse to $+40$ mV followed by a second 25 ms pulse to different membrane potentials between -120 and $+10$ mV. At the end of each experiment, the cell under study was perfused with E-4031 30 nM (a hERG blocker) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel).

I_{K1} protocol. Cells were held at a membrane potential of -90 mV. A voltage ramp protocol of 1 s duration, from -120 to $+40$ mV was applied each 11 s. We measured the peak inward current, in the presence or absence of acyl-CAR. At the end of each experiment, the cell under study was perfused with BaCl_2 150 μM (an I_{K1} blocker) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

I_{KS} protocols. Cells were held at a membrane potential of -70 mV. Steady-state current voltage relationships (IV) were obtained by stepping the membrane voltage for 3.5 s between -60 and $+40$ mV in 10 mV increments. Deactivating tail currents were recorded at -30 mV. The activation curves were obtained from the peak tail current amplitude. At the end of each experiment, the cell under study was perfused with Chromanol 293 B15 μM (an I_{KS} blocker) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

Command potentials, data acquisition and analysis were generated using Clampex 8.2 (Axon Instrument, Foster City, CA, USA).

Deactivating currents were best described by two exponentials using the following equation:

Table 1. Effect of application of intra- or extracellular acyl-CARs on I_{HERG} deactivation time constants. The hERG current was fitted to a two exponential function (see Methods for details).

Treatment		Tau 1 Mean \pm SEM	Tau 2 Mean \pm SEM	n
Control		1663 \pm 118.5	3144 \pm 26.5	12
Intracellular	3 μM C8-CAR	1378.6 \pm 75.1	263.3 \pm 12.1	8
	3 μM C10-CAR	1467.6 \pm 64.5	306.6 \pm 10.6	7
	3 μM C16-CAR	1658.4 \pm 105.8	323.5 \pm 15.8	12
	3 μM C18-CAR	1440.4 \pm 120.6	288.8 \pm 26.6	9
Extracellular	3 μM C8-CAR	1488.6 \pm 87.1	275.8 \pm 11.8	8
	3 μM C10-CAR	1667.9 \pm 101.1	301.5 \pm 17.8	7
	3 μM C16-CAR	1077.1 \pm 139.7**	222.2* \pm 21.3	7
	3 μM C18-CAR	1059.4 \pm 88.7**	212.6* \pm 18.9	8

The values of tau1 and tau2 are given in ms. Values were obtained when the membrane potential returned to -55 mV after stepping to -10 mV for 5s. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0041686.t001

$$I = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2).$$

where τ_1 and τ_2 are the time constants, A_1 and A_2 are the amplitude of the 1st and 2nd component of the exponential respectively and A_0 the amplitude of the remaining current.

Half-maximal voltages ($V_{1/2}$) of activation and availability were determined by fitting data with a Boltzmann equation:

$$I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[-(E - V_{1/2})/s]\}.$$

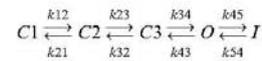
where I/I_{max} represents the normalized current, $V_{1/2}$ the half-maximal voltages of activation or availability and s the slope factor. These analyses were performed using Origin 7 (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

Acyl-CARs (except oleylcarnitine) were purchased from Drten Brink (Amsterdam, Netherland). Oleylcarnitine and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Two medium-chain acyl-CAR derivatives were used: octanoylcarnitine (C8-CAR) and decanoylcarnitine (C10-CAR) and two long-chain palmitoylcarnitine (C16-CAR) and oleylcarnitine (C18-CAR).

To simplify the terminology, we indicate the number of carbon atoms in the aliphatic chain. We used C18:1-CAR rather than C18:0-CAR because the C18:1 carnitine derivative is more abundant in the myocardium than C18:0, in both physiological and pathophysiological conditions [18]. A stock solution of 30 mM Acyl-CARs, dissolved in water, was diluted to experimental concentrations between 1 and 30 μ M.

Mathematical Modelling

The model used in this study is the human endocardial ventricular cell model described by Ten Tusscher & Panfilov [21] in which we replaced the Hodgkin-Huxley equation for I_{KR} by a Markov equation. Following Fink *et al.* [22] we chose to describe I_{KR} using the following Markov chain which had 3 closed states, one open state and one inactivated state:



The simplex method was used to fit the experimental data using JSim software.

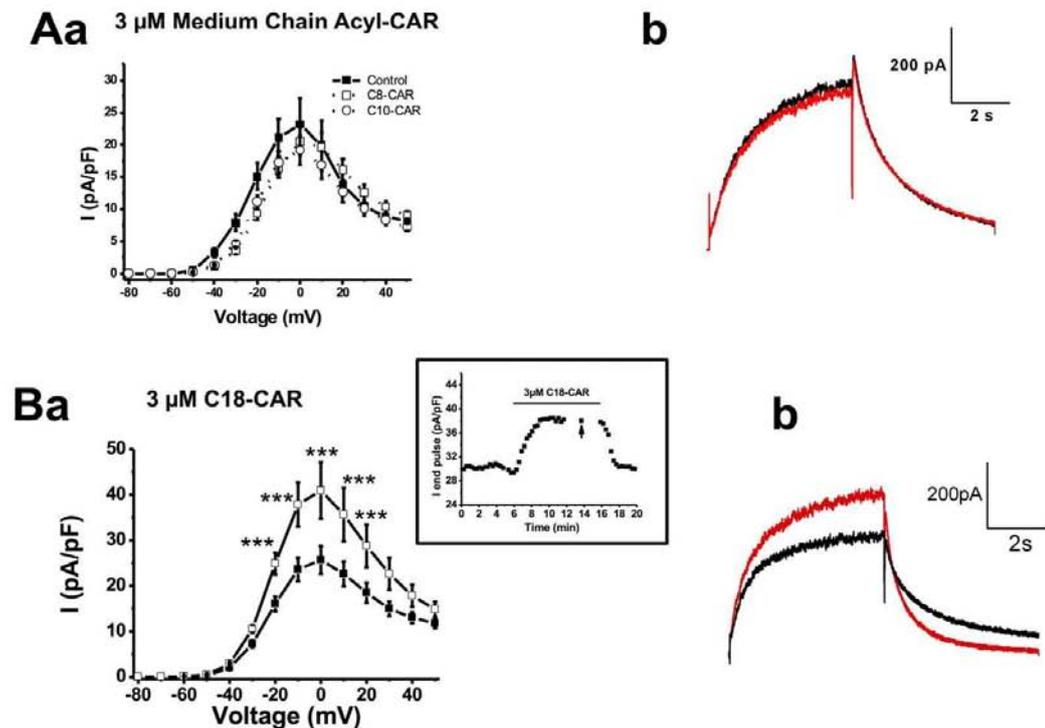


Figure 1. Effect of extracellular acyl-CARs on I_{hERG} - V_{hERG} relationships. In all graphs, the filled squares represent the current in the absence of acyl-CAR in the pipette (control, $n = 12$ cells). **Aa**, effect of 3 μ M C8-CAR (empty circles, $n = 8$ cells) or 3 μ M C10-acyl-CAR (filled circles, $n = 7$ cells); **Ab**, typical example of C8-CAR (red) compared with PSS (black). **Ba**, effect of 3 μ M C18-CAR (filled circles, $n = 9$ cells) on I_{hERG} - V relationship. The inset shows the effect of 3 μ M C18-CAR on end-pulse hERG current elicited by a depolarisation to -10 mV from a holding voltage of -70 mV, obtained on a representative cell (the arrows indicate the current obtained at -10 mV during an IV protocol, see Methods), ***, $p < 0.001$. **, $p < 0.01$. **Bb**, typical example of C18-CAR (red) compared with PSS (black). doi:10.1371/journal.pone.0041686.g001

The reaction constants were:
 $k_{12} = 0.01507341 \cdot \exp(0.001459408 \cdot V)$ in PSS and
 $k_{12} = 0.02007341 \cdot \exp(0.07865593 \cdot V)$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{21} = 0.05364064 \cdot \exp(-0.19822938 \cdot V)$ in PSS and
 $k_{21} = 0.2364064 \cdot \exp(-0.00011822938 \cdot V)$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{23} = 0.08927204$ in PSS and $k_{23} = 0.02927204$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{32} = 15686841$ in PSS and $k_{32} = 0.01686841$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{34} = 0.01066403 \cdot \exp(0.00131023 \cdot V)$ in PSS and
 $k_{34} = 0.15066403 \cdot \exp(0.0231023 \cdot V)$ in the presence of C16-CAR.

$k_{43} = 0.0005743 \cdot \exp(-0.0006156 \cdot V)$ in PSS and
 $k_{43} = 0.00037433 \cdot \exp(-0.04078603 \cdot V)$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{45} = 0.05042237 \cdot \exp(0.00854485 \cdot (V+18))$ in PSS and
 $k_{45} = 0.16042237 \cdot \exp(0.01554485 \cdot (V+4.5))$ in the presence of C16-CAR.
 $k_{54} = 0.01731608 \cdot \exp(-0.04090733 \cdot (V+18))$ in PSS and
 $k_{54} = 0.03731608 \cdot \exp(-0.05090733 \cdot (V+4.5))$ in the presence of C16-CAR.

Statistics

Data are described as mean \pm standard error of the mean (n = number of cells). Two-way repeated measures ANOVA followed

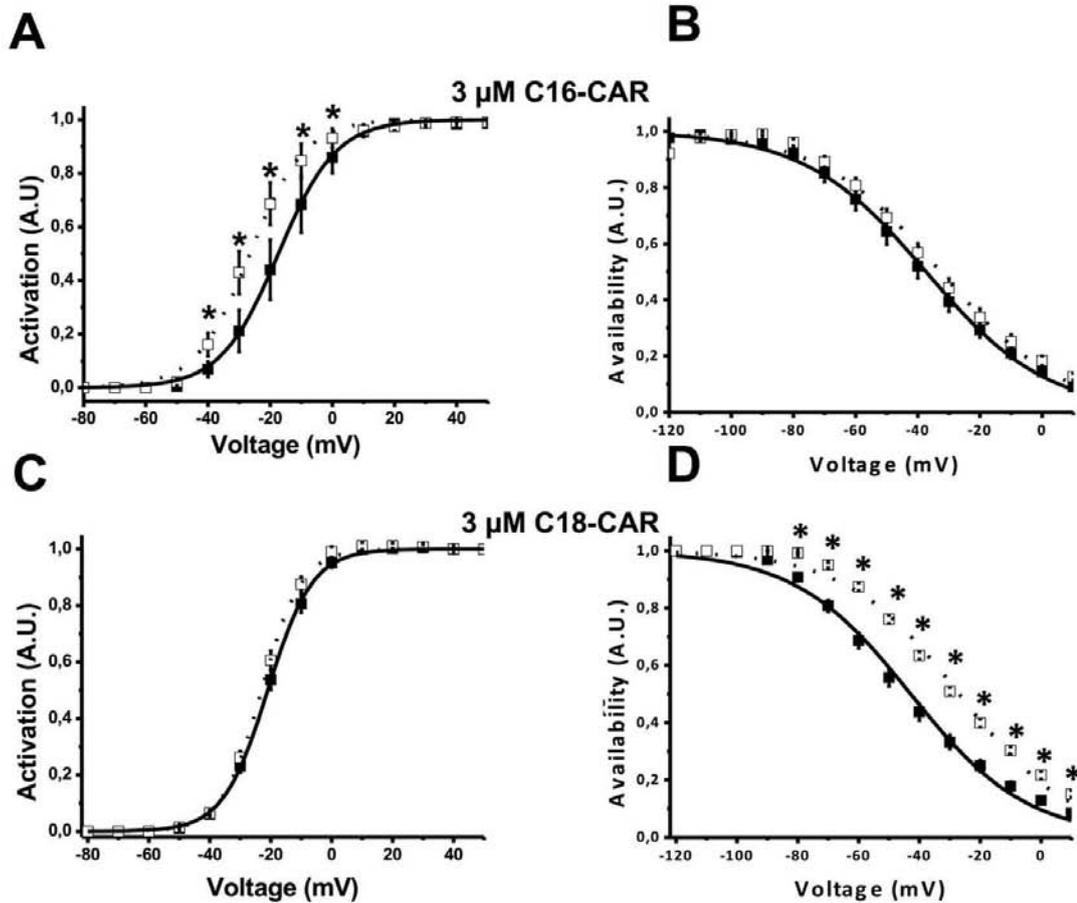


Figure 2. Effect of extracellular long-chain acyl-CARs on the activation and availability of the hERG current. **A**, effect of 3 μ M C16-CAR on the activation curve. In the absence of C16-CAR (filled squares, n=6 cells), the $V_{1/2}$ is -17.4 ± 0.2 mV while in the presence of 3 μ M acyl-CAR (empty squares) the $V_{1/2}$ is -26.5 ± 0.5 mV. **B**, effect of 3 μ M C16-CAR on availability. In the absence of C16-CAR (empty squares, n=6 cells), the $V_{1/2}$ is -35.4 ± 1.4 mV while in the presence of 3 μ M acyl-CAR (filled squares) the $V_{1/2}$ is -37.4 ± 0.5 mV. **C**, effect of 3 μ M C18-CAR on activation. In the absence of C18-CAR (filled squares, n=7 cells), the $V_{1/2}$ is -21.0 ± 0.1 mV while in the presence of 3 μ M acyl-CAR (empty squares) the $V_{1/2}$ is -23.0 ± 0.2 mV. **D**, effect of 3 μ M C18-CAR on availability. In the absence of C18-CAR (filled squares, n=7 cells) the $V_{1/2}$ is -42.9 ± 1.0 mV while in the presence of 3 μ M acyl-CAR (empty squares) the $V_{1/2}$ is -27.0 ± 1.0 mV. *: $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0041686.g002

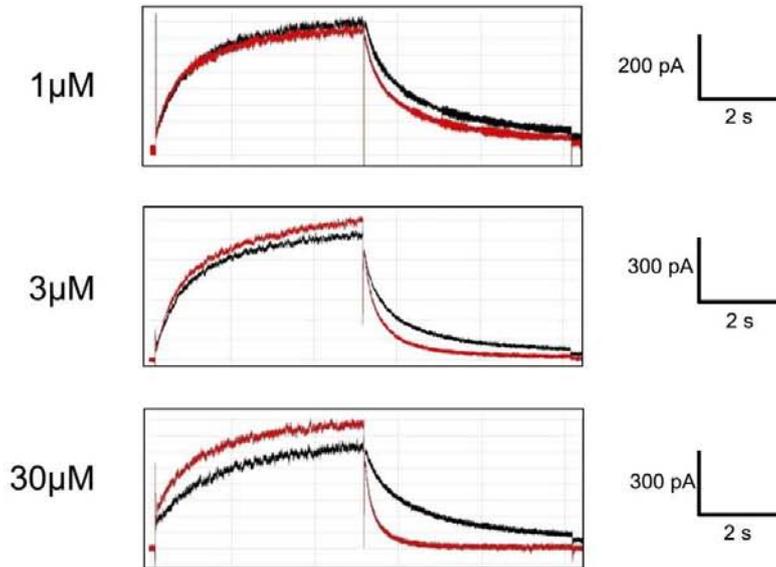


Figure 3. Concentration-dependent acceleration of I_{hERG} inactivation induced by C18-CAR. The records were obtained in 3 different cells. The current obtained in presence of C18-CAR is shown in red. doi:10.1371/journal.pone.0041686.g003

by a Student Newmann Keuls test were used to compare current densities. To compare the effects of acyl-CARs on the kinetics of deactivation, we performed unpaired (intracellular) and paired (extracellular) Student's t-test. Differences were considered as statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Acylcarnitines have no Impact on I_{hERG} when Applied Intracellularly

We compared I_{hERG} in the absence or presence of intracellular free carnitine, medium-chain acyl-CARs (e.g. C8-

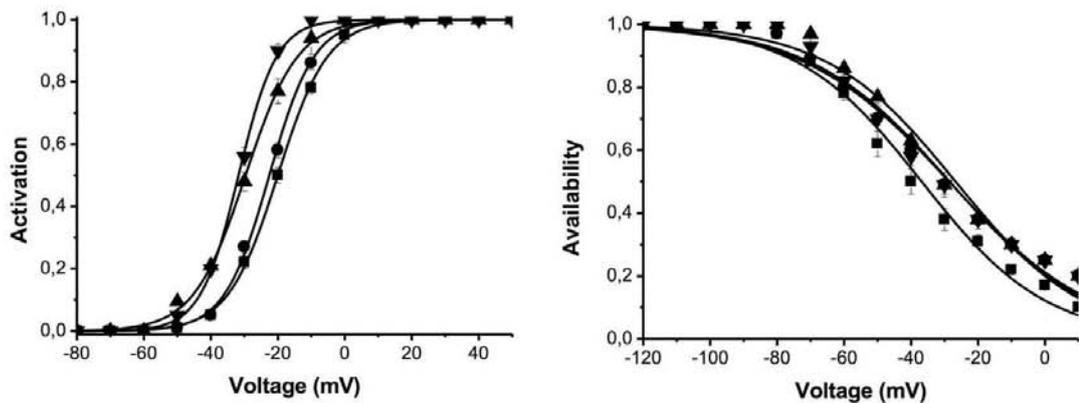


Figure 4. Effect of extracellular C18-CAR on hERG activation and availability. **A.** Activation curve in PSS (squares); $V_{1/2} = -20.3 \pm 0.1$ mV ($n = 10$); in the presence of 1 μ M C18-CAR (circles); -22.8 ± 0.1 mV ($n = 8$); in the presence of 3 μ M C18-CAR (diamonds); -30.0 ± 0.3 mV ($n = 8$) and in the presence of 10 μ M C18-CAR (triangles); -31.9 ± 0.9 mV ($n = 4$). **B.** Availability curve in PSS (squares); $V_{1/2} = -40.9 \pm 2.3$ mV ($n = 8$); in the presence of 1 μ M C18-CAR (circles); $V_{1/2} = -36.2 \pm 3.1$ mV ($n = 8$); in the presence of 3 μ M C18-CAR (triangles); $V_{1/2} = -34.8 \pm 1.4$ mV ($n = 8$) and in the presence of 10 μ M C18-CAR (diamonds); $V_{1/2} = -35.6 \pm 2.1$ mV. doi:10.1371/journal.pone.0041686.g004

Table 2. Effect of different concentrations of extracellular C18-CAR on I_{hERG} deactivation time constants.

Treatment	Tau1		Tau2	
	Mean ± SEM	n	Mean ± SEM	n
PSS	2331 ± 160	13	469 ± 37	13
C18-CAR 1 μM	2289 ± 154	8	431 ± 18	8
C18-CAR 3 μM	1659 ± 360**	4	326 ± 72*	4
C18-CAR 10 μM	772 ± 82***	3	191 ± 14**	3
C18-CAR 30 μM	638 ± 98***	4	176 ± 15***	6

Values obtained when the membrane potential returned to -55 mV after stepping to -10 mV for 5 s. *p<0.05, **P<0.01, *** P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0041686.t002

CAR and C10-CAR), or long-chain acyl-CARs(e.g. C16-CAR and C18-CAR). Compared to the physiological concentration (3 μM), absence of acyl-CAR in the pipette had no impact on I_{hERG} (data not shown). Raising the concentration of the various acyl-CARs from 3 μM to 30 μM had no effect on the amplitude of the current (data not shown). Similarly, the kinetics of deactivation of the current were not affected by the various acyl-CARs, whatever their chain length (Table 1). We concluded that CAR and acyl-CAR had no impact on I_{hERG} when applied intracellularly.

Long-chain Acylcarnitines Increase I_{hERG} Amplitude and Accelerate Deactivation when Applied Extracellularly

Acyl-CARs of various chain lengths were applied extracellularly. Free CARs (data not shown) or medium-chain acyl-CARs had no impact on the amplitude of I_{hERG} (fig.1A). In contrast, 3 μM C18-CAR increased the amplitude of the end-pulse current. This effect took about 2 minutes to be complete and occurred at almost

all voltages (fig. 1B). Similar results were obtained with 3 μM C16-CAR, another LCAC derivative (data not shown). External application of 3 μM C16-CAR for about 4 minutes led to a significant leftward shift of the activation curve without any effect on the availability properties (fig. 2A and 2B). Conversely, C18-CAR did not affect the activation properties while the availability curve was shifted to the right (fig. 2C and 2D). We concluded from these experiments that extracellularly-applied long-chain acyl-CAR increased I_{hERG} amplitude in a manner, dependent on their chain length.

LCAC also affected deactivation kinetics when they are applied extracellularly, 3 μM C16-CAR and C18-CAR significantly increased deactivation kinetic (by about 30-35%), whereas medium-chain acyl-CAR had no effect on deactivation (fig. 3 and Table 1).

The Effects of Long-chain Acylcarnitines are Dose-dependent

Increasing the concentration of C18-CAR from 1 to 30 μM caused an increase in I_{hERG} amplitude (fig. 4) and deactivation kinetics (Table 2). Similar results were obtained with C16-CAR (data not shown).

Accelerated Deactivation is not Due to Fatty Acid Alone

In order to understand the specificity of the effect of long-chain acyl-CAR on hERG channels, we investigated the effects of two long-chain free fatty acids with the same chain length. Extracellular application of 3 μM palmitoyl methyl ester (C16:0) or oleyl methyl ester (C18:1) caused a leftward shift of the activation curve with no change in the availability curve, reproducing increase of I_{hERG} amplitude caused by long-chain acyl-CARs (data not shown). In contrast, long-chain fatty acids did not change the deactivation kinetics (Table 3 and fig. 5). This suggests that the effect of long-chain acyl-CARs on the deactivation of I_{hERG} was specifically related to long-chain acyl-CAR derivatives.

Table 3. Effect of extracellular C16 free fatty acid either alone or in combination with C16-CAR on I_{hERG} deactivation time constants.

Tau1							
Voltage (mV)	PSS		C16		C16+ C16-CAR		
	Mean ± SEM	n	Mean ± SEM	n	Mean ± SEM	n	
-30	2620.3 ± 497.6	6	2780.7 ± 220.7	5	2620.3 ± 497.6	6	
-20	2661.7 ± 226.9	6	2131.7 ± 148.9	5	2661.7 ± 226.9	6	
-10	2076.7 ± 85.1	7	2012.8 ± 122.1	7	2076.7 ± 85.1	7	
0	2070.5 ± 133.4	7	1973.2 ± 135.8	7	2070.5 ± 133.4	7	
10	2028.8 ± 116.7	7	1927.7 ± 113.4	7	2028.8 ± 116.7	7	
Tau 2							
-30	670.3 ± 123.6	5	587.5 ± 52.4	7	370.5 ± 48.6*	7	
-20	590.1 ± 87.3	7	522.4 ± 88.7	7	284.8 ± 36.2***	7	
-10	381.0 ± 23.1	7	364.3 ± 22.5	7	257.0 ± 29.0**	7	
0	349.3 ± 24.2	7	337.9 ± 25.4	7	242.0 ± 27.3***	7	
10	339.8 ± 22.6	7	310.8 ± 13.2	7	236.4 ± 25.5***	7	

Values obtained when the membrane potential returned to -55 mV after stepping to the voltage indicated in the left column in mV for 5 s. The current was fitted to a two exponential function (see Methods). The values of tau1 and tau2 are expressed in ms. *p<0.05, **P<0.01, *** P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0041686.t003

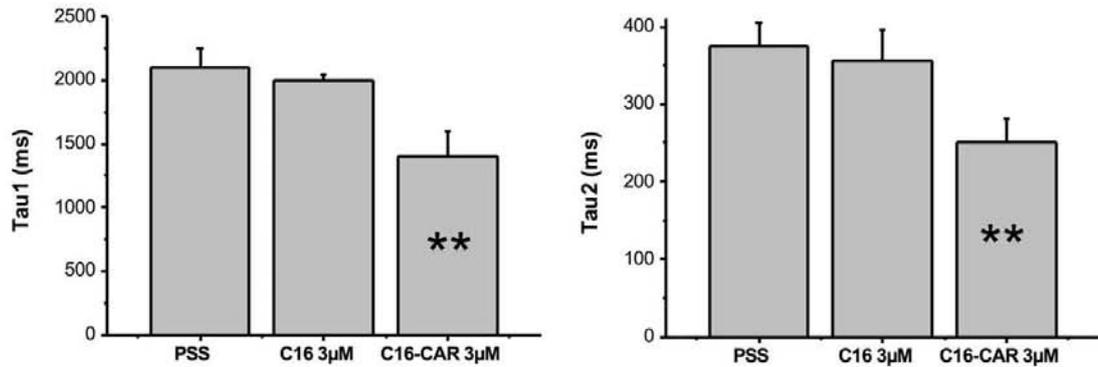


Figure 5. The effect of extracellular C16 or C16-CAR on deactivation kinetics of I_{hERG} when membrane potential returned to -55 mV from a 5 s to -10 mV. ** $p < 0.01$.
doi:10.1371/journal.pone.0041686.g005

Acylcarnitines do not Affect $K_{IR2.1}$ or $Kv7.1/minK$ Channels

To evaluate a possible impact of extracellular acyl-CAR on the $K_{IR2.1}$ channel, we compared the current in the absence or presence of long-chain acyl-CARs. At concentrations up to $10 \mu M$, C16-CAR has no effect on I_{K1} amplitude (fig. 6). Application of $3 \mu M$ C16-CAR had no effect on $Kv7.1/minK$ channel amplitude (fig. 7) or kinetics (data not shown).

Discussion

Summary of Results

In this study we compare the effects of free carnitine and acyl-CAR on $hERG$, $Kv7.1/minK$ and $K_{IR2.1}$ channels. Acyl-CARs with different aliphatic hydrocarbon tail lengths, were applied at different concentrations to both intra- and extracellular sides of the cell membrane. Palmitoyl-carnitine had no effect on $K_{IR2.1}$ and $Kv1.7/minK$ at concentrations up to $10 \mu M$ but some effects were

observed on the $hERG$ channel. These effects were specific to extracellular LCAC. Intracellular application of free carnitine or acyl-CARs had no effect on any current, irrespective of the acyl chain length. At the extracellular side of the membrane, free carnitine and medium-chain acyl-CAR up to $30 \mu M$ had no effect. Only LCAC had some effects on $hERG$ current.

When applied extracellularly, LCACs induced increased I_{hERG} probably due to the leftward shift of the activation for C16-CAR and rightward shift of the availability for C18-CAR. This effect began at $1 \mu M$, a physiological concentration of LCAC, and increased dose-dependently. Since other potassium channels ($K_{IR2.1}$ and $Kv7.1/minK$) were not sensitive to LCAC, it is likely that these are direct effects on the channel protein and not due to any non-specific effects of the lipophilic compounds on the plasma membrane. These results suggest a tonic regulatory role of physiological concentrations of long-chain acyl-CAR on I_{KR} .

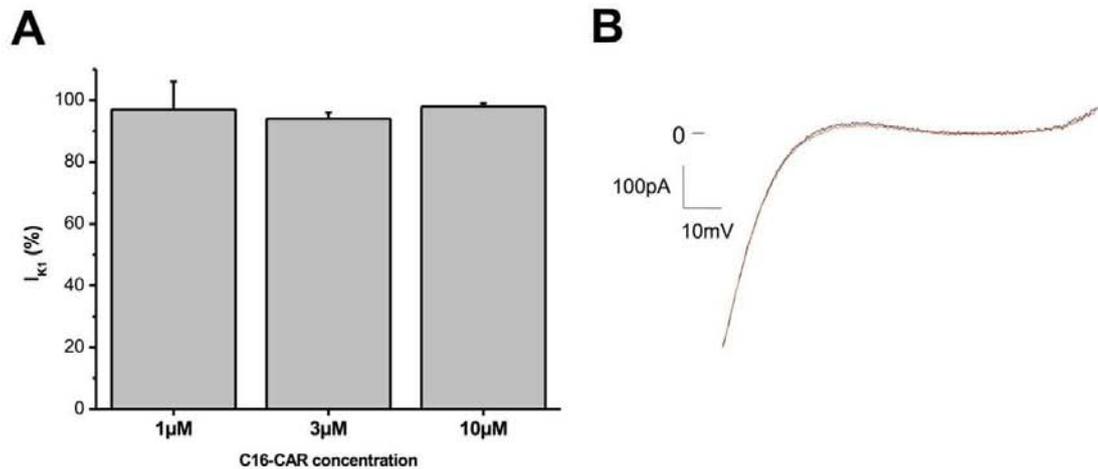


Figure 6. Effect of C16-CAR on I_{k1} . **A**, mean current measured at -120 mV and normalized to the current in PSS ($n = 7$ cells). **B**, typical example of I_{k1} elicited by a ramp of voltage between -120 and $+40$ mV, with (red) or without (black) $10 \mu M$ C16-CAR.
doi:10.1371/journal.pone.0041686.g006

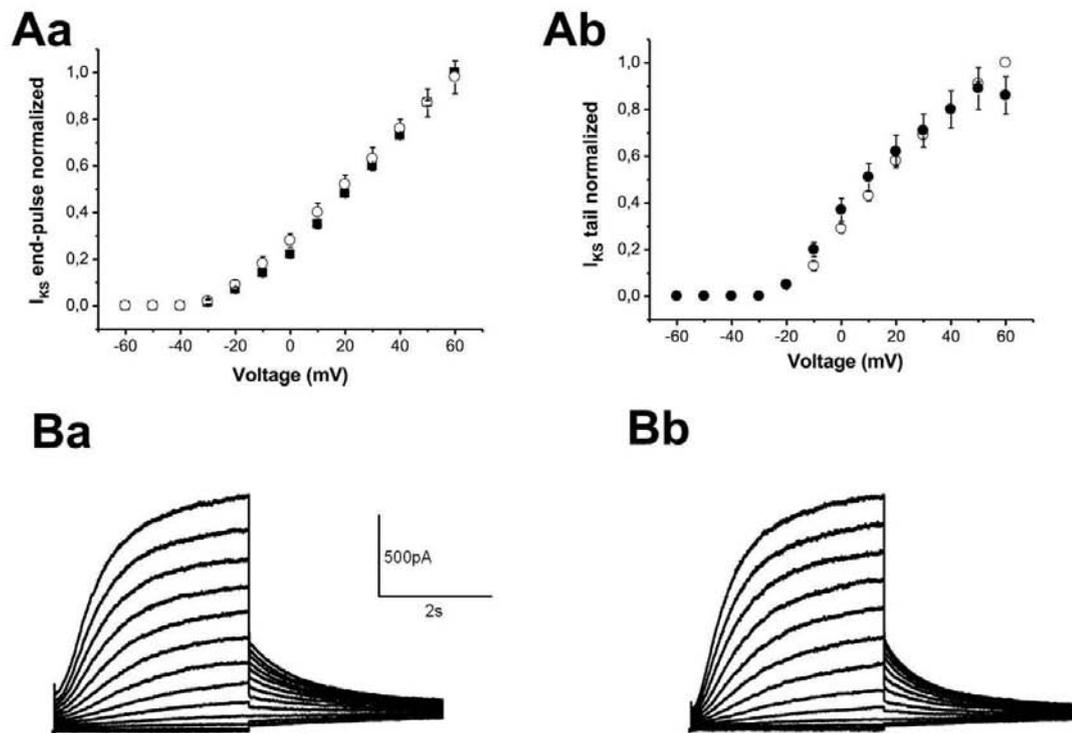


Figure 7. Effect of 3 μ M C16-CAR on I_{KS} . A, I_{KS} -V curves of the current at the end of the pulse (Aa) and peak tail current (Ab). B, Typical examples of families of currents in the absence (Ba) and presence of C16-CAR (Bb). doi:10.1371/journal.pone.0041686.g007

Effects of Long-chain Acylcarnitines on Other Ion Channels

The regulation of ion channels by acyl-CAR has been widely studied in recent years. In every case, the comparison was between high concentrations of LCAC (up to 30 μ M) and no LCAC, two situations now known to be pathological. Most of these previous studies were focused on the specific effect of C16-CAR. Various effects have been described depending on whether the acyl-CAR was applied extra- or intracellularly and also depending on the technique used to study the currents. Wu and Corr [12] found that C16-CAR applied extra- or intracellularly led to an inhibition of the whole-cell L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. Conversely, Liu and Rosenberg [23] found that 1 μ M C16-CAR increased the open probability of reconstituted cardiac L-type calcium channels in membrane bilayers. I_{KATP} was blocked by micromolar concentrations of C16-CAR when applied to the internal face of the membrane in the inside-out configuration of the patch clamp technique [24]. Sato *et al.* [25] reported that this amphipathic molecule reduced I_{K1} but only when it is applied at concentrations higher than 10 μ M. Sato *et al.* reported a reversible blockade of the sodium current associated with a slowing of both activation and inactivation properties when 5 μ M C16-CAR was applied extracellularly [26]. Rat cardiac ventricular I_{TO} was inhibited by C16-CAR in a dose-dependent manner when present in the pipette solution, but had no effect

when superfused extracellularly [27]. In agreement with our results, these authors did not observe any effect on I_{K1} whether the amphipathic molecule was applied intra- or extracellularly at concentrations up to 10 μ M.

Surprisingly, there has been no previous study of the effects of LCAC on the hERG (or I_{KR}) and I_{KS} even though these channels are considered to be the target of drugs which seek to prevent ventricular fibrillation and sudden cardiac death see [15].

Effects of Long-chain Acylcarnitines on hERG Channel

From our experiments on HEK293 cells stably expressing hERG, we can infer that LCAC regulate hERG channel activity via an extracellular site. Indeed, long-chain acyl-CARs are associated with an increase in the speed of deactivation of the channel compared to the "pathological" condition where acyl-CAR is absent. This effect is dose-dependent, at least up to 30 μ M. Both, C16-CAR and C18-CAR increase the amplitude of the current but the mechanism of increased current amplitude is different. C16-CAR induced a shift of the activation curve in the hyperpolarizing direction without any effect on the availability curve. C18-CAR has no effect on the activation curve but provoked a shift in the availability curve in the depolarizing direction. Interestingly, quite similar results were obtained by Wang *et al.* [28] with lysophosphatidylcholine (LPC) having a C16:0 or C18:1 as acyl groups. Changing the positively charged phosphatidylcholine with phosphatidylcholineglycerol was associ-

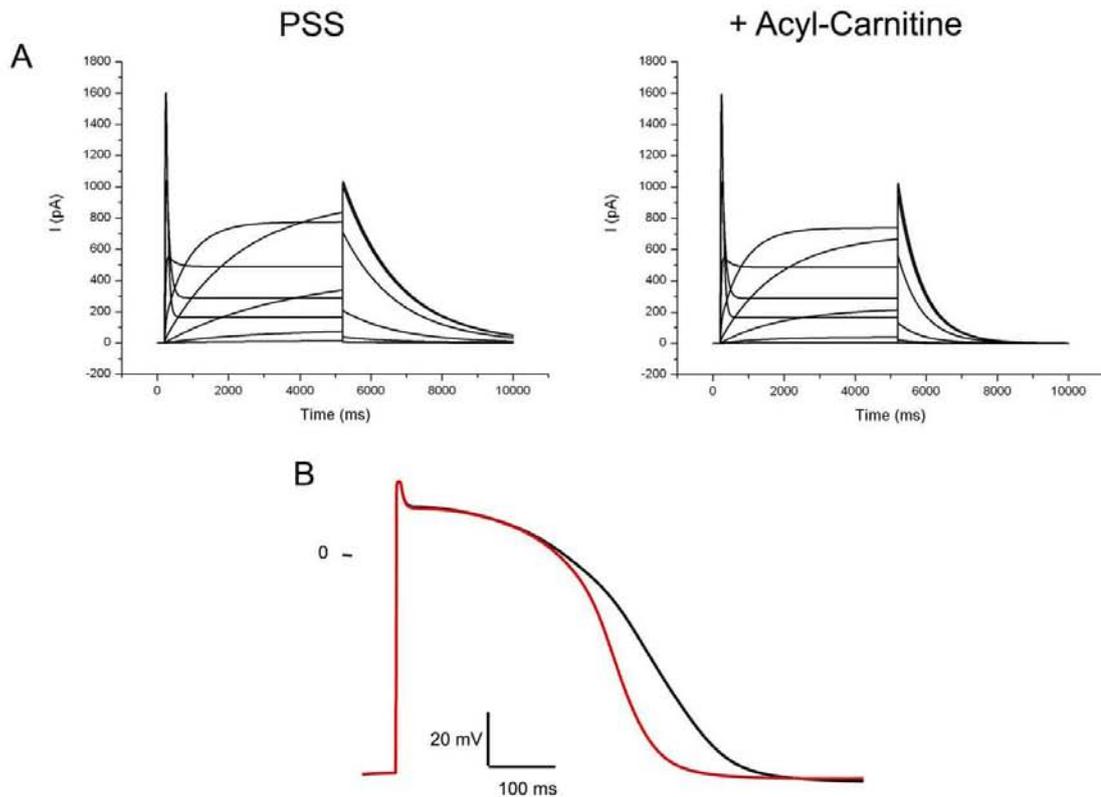


Figure 8. Computer simulation of the effects of LCAC on I_{KR} and the human ventricular action potential. A, families of currents mimicking I_{KR} with or without acyl-CARs. B, action potential profile in the absence of acylcarnitine (black line) or the presence of a physiological concentration of 3 μ M LCAC (red line). doi:10.1371/journal.pone.0041686.g008

ated with substantial modifications of the effects underlying the important role played by this charged head. These authors concluded that the effects they observed were not due to membrane incorporation of the lipids or to any intracellular signalling pathways currently known to be related to these lipids. They proposed that there must be a direct interaction of the lysophospholipid molecules with the channel protein. However, they also proposed that these lipids could modify hERG activity *via* unidentified pathways. In the present work, we found that acyl-CARs had no effect on the hERG current, at concentrations up to 30 μ M. So either these lipids do not incorporate into the membrane or their incorporation has no effect on the activity of the ion channel. In contrast, LCAC can incorporate into the plasma membrane and modify membrane fluidity. However, there is no effect of the fatty acids palmitate and stearate that can also integrate the membrane. Also, LCAC does not affect $K_{IR2.1}$ and $K_{v7.1}/mink$ currents. Thus, the electrophysiological effects of LCAC on I_{hERG} are dependent on the aliphatic hydrocarbon tail length but are unlikely to involve changes in plasma membrane properties. These results are in agreement with previously reported cases of cardiac arrhythmias associated with inherited fatty acid oxidation disorders in human. Indeed, Bonnet *et al.* [29] reported that cardiac arrhythmias and sudden death were usually observed in patients with genetic disorders of long-chain fatty acid oxidation

associated with long-chain acyl-CAR accumulation. In contrast, cardiac electrical disturbances were absent in patients with medium-chain fatty acid oxidation deficiency, a condition associated with a specific increase in medium-chain acyl-CAR but normal long-chain derivatives [28].

Our observations suggest that there is a dual interaction of the acyl group and the charged head of the LPC or LCAC with the channel. Since the physiological concentration of LCAC is between 1 and 3 μ M [5–6], [18], there must be a tonic regulation of hERG channels by long-chain acyl-CAR under physiological conditions.

Consequences of Extracellular Accumulation or Depletion of Long-chain Acylcarnitines under Pathological Conditions

Acyl-CAR concentration can reach 10 μ M in some pathological conditions such as myocardial ischaemia [7], diabetes [8], [9], or genetic fatty acid disorders [10]. Conversely there is a drop in CAR and acyl-CAR cytosolic concentrations in primary systemic carnitine deficiency [2]. All these pathological situations are associated with cardiac arrhythmias and sudden cardiac death [29–32], [2]. Accordingly, hERG regulation by LCAC could play a

role in the cardiac arrhythmias genesis observed in these pathological conditions.

Consequences for the Action Potential?

An increase of I_{KR} , the cardiac current encoded by hERG, could lead to a reduction of the action potential duration. However, it is known that this channel inactivates and reactivates very rapidly leading to a higher current during the final repolarisation phase than during the plateau phase of the action potential. Since the deactivation of the current is accelerated, the current during the action potential must be lower. Indeed, Clancy and Rudy [33] reported a case of congenital long QT syndrome due to a mutation of hERG leading to an acceleration of I_{KR} deactivation kinetics (see also Rudy and Silva [34]). This speeding of deactivation could overcome the effect on the increased amplitude. To investigate this point, we simulated hERG current in the presence and absence of C16-CAR 3 μ M using Markov equations (see methods). Introducing such a current in the human endocardial ventricular cell model developed by Ten Tusscher and Panfilov [21] showed that the regulation of the hERG by C16-CAR could be responsible for a pronounced shortening of the

action potential. This indicates that with the absence of carnitine, there must be an increased APD (fig. 8) while the opposite could be induced with an accumulation of LCAC, both conditions being potentially pro-arrhythmic.

Summary

The results of this study demonstrate that long-chain acyl-CARs have regulatory properties on the hERG channel. These electrophysiological effects were not observed with medium-chain acyl-CARs. This emphasizes the relationship between long-chain fatty acid metabolism and cardiac electrical activity that contribute to cardiac arrhythmias associated with LCAC depletion or accumulation occurring in some pathologies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FF AO TAT PF PB DB FL JYL. Performed the experiments: FF AO TAT PF PB DB FL JYL. Analyzed the data: FF AO TAT PF PB DB FL JYL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FF AO TAT PF PB DB FL JYL. Wrote the paper: FF AO TAT PF PB DB FL JYL.

References

- Kodde I, Van der Stok J, Smolenski R, de Jong J (2007) Metabolic and genetic regulation of cardiac substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(1): 26–39.
- Stanley C (2004) Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci* 1033: 42–51.
- Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, et al (2004) Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1033: 79–91.
- McGarry J, Mills S, Long C, Foster D (1983) Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 241: 21–28.
- Opalka J, Gellerich F-N, Zierz S (2001) Age and sex dependency of carnitine concentration in human serum and skeletal muscle. *Clin Chem* 47: 2150–2153.
- Jones M, Goodwin S, Amjad S, Chalmers R (2005) Plasma and urinary carnitine and acylcarnitines in chronic fatigue syndrome. *Clin Chim Acta* 360: 173–177.
- Ford D, Han X, Horner C, Gross R (1996) Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischaemia: metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry* 35(24): 7903–7909.
- Lopaschuk G (1996) Abnormal mechanical function in diabetes: relationship to altered myocardial carbohydrate/lipid metabolism. *Coron Artery Dis* 7(2): 116–123.
- An D & Rodrigues B (2006) Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4): H1489–H1506.
- Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M (2006) Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C(2): 77–85.
- DaTorre S, Creer M, Pogwizd S, Corr P (1991) Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 23 Suppl 1: 11–22.
- Wu J, Corr P (1992) Influence of long-chain acylcarnitines on voltage-dependent calcium current in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 263: 410–417.
- Wu J, Corr P (1995) Palmitoylcarnitine increases $[Na^+]_i$ and initiates transient inward current in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268: H2405–H2417.
- Brugada R, Hong K, Gordeiro J, Dumaine R (2005) Short QT syndrome. *CMAJ* 173: 1349–1354.
- Champroux P, Viaud K, El Amrani A, Fowler J, Martel E, Le Guennec J-Y, Richard S (2005) Prediction of the risk of Torsade de Pointes using the model of isolated canine Purkinje fibres. *Br J Pharmacol* 144: 376–385.
- Schimpf R, Wolpert G, Gatta F, Giustetto C, Borggrefe M. (2005) Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 67: 357–366.
- Hedley P, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, et al. (2009) The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human Mutat* 30(9): 1256–1266.
- Su X, Han X, Mancuso D, Abendschein D, Gross R (2005) Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics. *Biochemistry* 44: 5234–5245.
- Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, et al. (1998) Properties of hERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *J Biophys* 74: 230–41.
- Pascarel C, Hongo K, Cazorla O, White E, Le Guennec J-Y (1998) Different effects of gadolinium on I_{KR} , I_{KS} and I_{K1} in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 124: 356–360.
- Ten Tusscher K & Panfilov K (2006) Alternans and spiral breakup in a human ventricular model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1068–H1100.
- Fink M, Noble D, Virag L, Varro A, Giles W (2008) Contributions of hERG K^+ current to repolarization of the human ventricular action potential. *Prog Biophys Mol Biol* 96(1–3): 357–376.
- Liu Q-Y, Rosenberg R (1996) Activation and inhibition of reconstituted cardiac L-type calcium channels by palmitoyl-L-carnitine. *Biochem Biophys Res Comm* 228: 252–258.
- Haruna T, Horie M, Takano M, Kono Y, Yoshida H, et al. (2000) Alteration of the membrane lipid environment by L-palmitoylcarnitine modulates KATP channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 441: 200–207.
- Sato T, Arita M, Kiyosue T (1993) Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K^+ channels of guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 7: 575–584.
- Sato T, Kiyosue T, Arita M (1992) Inhibitory effects of palmitoylcarnitine and lysophosphatidylcholine on the sodium current of cardiac ventricular cells. *Pflügers Arch* 420: 94–100.
- Xu Z, Rozanski G (1998) K^+ current inhibition by amphiphilic fatty acid metabolites in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 275(6): C1660–C1667.
- Wang J, Zhang Y, Wang H, Han H, Nattel S, et al. (2004) Potential mechanisms for the enhancement of hERG K^+ channel function by phospholipids metabolites. *Br J Pharm* 141: 586–599.
- Bonnet D, Martin D, De Lonlay P, Villain E, Jouvet P, et al. (1999) Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 100: 2248–2253.
- Bergner D & Goldberger J (2010) Diabetes mellitus and sudden cardiac death: what are the data? *Cardiol J* 17(2): 117–129.
- Pappone C & Santinelli V (2010) Cardiac electrophysiology in diabetes. *Minerva Cardio angi* 58(2): 269–276.
- Siscovick D, Sotoodehnia N, Rea T, Raghunathan T, Jouven X, et al. (2010) Type 2 diabetes mellitus and the risk of sudden cardiac arrest in the community. *Rev Endocr Metab Disord* 11(1): 53–59.
- Clancy C & Rudy Y (2001) Cellular consequences of hERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 50(2): 301–313.
- Rudy Y, Silva J (2006) Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. *Q Rev Biophys* 39: 57–116.

4 Matériels et Méthodes supplémentaires.
Configurations du patch – clamp utilisées.

4.1 Configuration « patch rompu » ou « whole – cell ».

Pour toutes nos expériences nous avons utilisé des pipettes en verre borosilicate, où l'extrémité a un diamètre d'environ 1 μm . Le méthode du patch-clamp consiste à rapprocher la pipette de la membrane cellulaire, à toucher doucement la membrane cellulaire et à exercer une petite pression négative. Cette dernière aide l'interaction électrique entre le verre et la bicouche lipidique. Le but est d'atteindre le « seal » ou « gigaseal », c'est-à-dire avoir une résistance entre le verre et la membrane supérieure à 10^9 ohm. A cette étape nous avons la configuration dite « cellule attachée » ou « cell-attached ». Il est alors possible d'enregistrer des courants qui viennent de la portion de la membrane à l'intérieur de la pipette.

A partir de la configuration cellule-attachée, plusieurs configurations sont possibles. Celle que nous avons utilisé dans nos expériences pour l'étude des courants I_{KR} , I_{K1} et I_{CaL} , s'appelle cellule entière ou « whole-cell ». Pour atteindre cette étape, un fois que nous sommes en cellule attachée, il faut exercer une légère pression négative à travers l'aspiration. La membrane en contact avec l'extrémité de la pipette se rompt et les morceaux de membrane cassée se collent contre l'intérieur de la pipette, grâce à l'interaction électrique verre - membrane. Cette configuration est aussi appelée « patch-rompu ». La qualité du seal, le diamètre de la pipette, la qualité de la rupture membranaire et la forme de l'extrémité de la pipette déterminent la résistance d'accès (R_a), c'est-à-dire la somme de toutes les résistances en série du système. Quand nous sommes en cellule entière nous avons un accès électrique et chimique à l'intérieur de la cellule. Le liquide présent dans la pipette va se substituer au cytoplasme de la cellule. Le volume de la cellule est négligeable par rapport au volume de la pipette, donc le contenu de la cellule est lavé. La composition du liquide intrapipette (MIP) et celle du liquide qui baigne la surface extracellulaire (Physiological Standard Solution, PSS) est contrôlé. L'aspect positif de cette configuration est le contrôle précis de la composition du MIP qui sera celle en contact avec la surface interne de la membrane cellulaire après quelques minutes de dialyse. La composition du PSS est aussi connue, l'expérimentateur peut donc gérer la composition au niveau qualitative et quantitative des ions, éventuels bloqueurs, agonistes ou autres genres de molécules.

Le terme cellule entière vient du fait que nous pouvons interagir avec la membrane cellulaire de toute la cellule, et donc tous ses canaux. Nous pouvons contrôler et mesurer le voltage, le courant et la réaction de l'ensemble de la membrane cellulaire en même temps.

4.2 Configuration « patch perforé ».

Le patch rompu est une configuration largement utilisée en patch-clamp et que nous avons utilisé pour la plupart de nos expériences. Un fois que la membrane est rompue, il y a la création d'un passage physique entre la pipette et le cytoplasme. Cela permet de interagir avec les canaux de tous la membrane cellulaire. Par contre cette configuration ne rende pas possible l'étude du courant I_{KS} . Pour ce courant nous avons utilisé la configuration dite « patch – perforé ».

Certains canaux, surtout parmi les potassiques, ont besoin des molécules présentes normalement dans le cytoplasme pour leur activité. Parmi ces molécules nous trouvons souvent des nucléotides ou le Ca^{2+} . La configuration du patch rompu entraine une dilution de ces molécules. Il y a ainsi la perte d'activité de certains canaux après quelques seconds ou minutes. Cet effet est appelé « run-down ». Pour éviter ce phénomène nous pouvons ajouter dans le MIP la substance à la concentration nécessaire pour garder la correcte activité du ou des canaux étudiés. Par contre il arrive que ce substance ou que la concentration de celle-ci ne soit pas bien connues, ce qui rende cette solution non réalisable. Pour résoudre ce problème, dans les années 1980 la configuration patch-perforé (« perforated patch ») a été introduite. Dans cette configuration, l'étape de cellule attachée n'est pas suivie par la pression négative à l'intérieur de la pipette et la rupture de la membrane. Au contraire, nous ajoutons au MIP des antibiotiques comme l'amphotéricine B ou la nystatine, qui créent en quelques minutes des pores à travers la membrane. Ces pores permettent le passage des ions monovalents (Na^+ , K^+ , Cl^-) mais ils représentent une barrière physique pour les molécules plus grandes ou chargée différemment (figure 14). De cette façon nous pouvons mesurer les courants sans la perte da parte de la cellule des molécules nécessaire à l'activité des canaux.

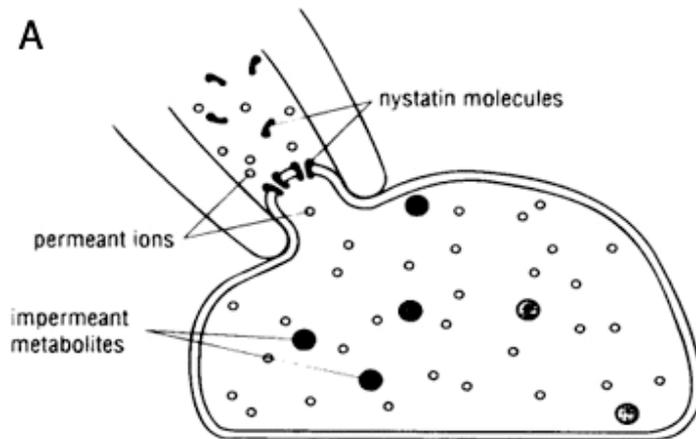


Figure 14. Représentation du patch – perforé.

La nystatine permet la formation des pores dans la membrane de la cellule. Ceci permettent le passage des ions monovalents (et la mesure du courant) mais ils empêchent le passage des autres molécules, ainsi ils préservent le cytoplasme. Modifié d’après http://mitochondria.inje.ac.kr/01_intro/

Le patch perforé nécessite d’un scellement de très bonne qualité, parce que la diffusion de petite quantité de antibiotique hors de la pipette et autours la zone du patch, peut entrainer une fragilisation de la membrane et une fuite importante. Un autre aspect négatif de cette configuration par rapport à la configuration cellule entière, est le temps. Une fois en configuration cellule attachée, pour passer en cellule entière, la rupture de la membrane est presque instantanée. Par contre, pour atteindre le patch perforé, il faut attendre plusieurs minutes pour la formation des pores, pendant lesquelles la qualité de scellement ne doit pas diminuer.

L’Amphotéricine B, aussi appelée fungizone et utilisée en culture cellulaire comme antimycotique car il a une grande affinité pour un stérol de la membrane cellulaire des champignons. A concentration plus élevée il est utilisé en patch-clamp pour la formation de ces pores grâce à son affinité au cholestérol (Lippiat 2008).

Ces antibiotiques sont sensibles à la lumière donc il faut conserver les tubes dans du papier d’aluminium à l’abri de la lumière naturelle et artificielle. La solution mère doit être faite dans du diméthyl-sulfoxyde (DMSO).

Nous avons essayé l'amphotéricine B et la nystatine pour ce genre de configuration. Après le test nous avons préféré la nystatine pour une légère amélioration de la stabilité du seal. Pour la solution mère, il faut solubiliser l'antibiotique dans un petit tube contenant du DMSO à l'aide du sonicateur et à l'abri de la lumière. Cette solution peut être gardée 1-2 jours à -20°C. Des solutions filles du MIP avec nystatine à 0.250 mg/mL sont fraîchement préparées plusieurs fois au cours de la journée. Cette solution est stable pendant 3-4 heures. Pour faciliter l'expérience nous avons baigné le bout de la pipette remplie de MIP avec de la nystatine dans du MIP sans nystatine pendant 4-8 secondes : le MIP sans nystatine remplira l'extrémité de la pipette par capillarité (figure 15). De cette façon la première solution qui touche la membrane cellulaire pendant le scellement sera sans antibiotique et nous permettra d'atteindre le gigaseal sans fragilisation membranaire. Plus la pipette est plongée longtemps dans le MIP sans nystatine, plus nous avons de temps pour atteindre le gigaseal avant la fragilisation causée par l'antibiotique qui arrive à l'extrémité de la pipette.

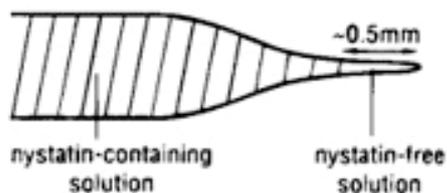


Figure 15. Schéma de la pipette du patch contenant la nystatine.

L'extrémité de la pipette est remplie avec du MIP sans nystatine, permettant de atteindre le scellement sans endommager la membrane cellulaire. Modifié d'après http://mitochondria.inje.ac.kr/01_intro/img/

Après avoir obtenu le seal au fur et au mesure de la formation des pores dans la membrane, nous pouvons observer l'augmentation des pics capacitifs et l'accélération de la relaxation du courant capacitif. Une fois que la résistance d'accès est au dessous d'une valeur acceptable (pas plus de 5 fois la résistance de la pipette) et est stable nous pouvons débiter l'enregistrement.

5 Résultats Complémentaires (I_{CaL})

Dans cette étude nous avons étudié les effets de la carnitine et de plusieurs AC de différentes longueurs de chaîne sur l'activité de quatre courants (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{CaL}) à l'aide de la technique du patch-clamp. Les résultats obtenus pour les trois canaux potassiques repolarisants font l'objet de notre publication « Long-Chain Acylcarnitines regulate hERG channel » (Ferro F. et al., PLoS ONE 2012). Les résultats concernant le canal calcique de type L, ont d'abord été obtenus sur la lignée HEK293- I_{CaL} puis sur des cardiomyocytes de ventricule de rat. Des résultats complémentaires sont attendus en vue d'une éventuelle publication. Ils seront exposés dans ce chapitre « Résultats Complémentaires ».

5.1 Matériels et Méthodes Complémentaires pour l'étude du canal calcique du type L.

Des expériences similaires à celles réalisées pour l'étude des canaux ioniques potassiques (Ferro *et al.*, 2012) ont également été réalisées pour l'étude du canal calcique de type L, d'abord en France sur la lignée HEK293- I_{CaL} , puis en Italie sur cardiomyocytes isolés de rat.

5.1.1 Solutions utilisées pour l'étude du canal calcique.

Le MIP utilisé pour étudier le courant I_{CaL} dans les cellules HEK293 a été :

	Concentration (mM)
NMDG	130
TEACl	10
Na ₂ ATP	3
MgCl ₂	1
EGTA	10
HEPES	10
	pH ajusté à 7,20 avec HCl

Tableau 1. Composition du MIP pour l'étude du courant calcique pour les cellule HEK293- I_{CaL} .

Le PSS utilisé pour étudier le courant I_{CaL} dans les cellules HEK293 a été :

	Concentration (mM)
NaCl	106
TEACl	30
CaCl ₂	10
MgCl ₂	1
HEPES	5
Glucose	10
	pH ajusté à 7,40 avec TEA-OH

Tableau 2. Composition du PSS pour l'étude du courant calcique pour les cellule HEK293- I_{CaL} .

Le courant de ce canal est plutôt faible, donc les variations de l'amplitude sont difficiles à voir et risquent d'être masquées par le bruit de fond. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé une concentration extracellulaire de calcium non physiologique (10 mM au lieu de 2 mM), afin d'augmenter la force électromotrice et de mesurer un courant avec une plus grande amplitude.

Le TEA (TetraEthylAmmonium), sert à bloquer les canaux ioniques potassiques voltages dépendent endogènes de la lignée HEK293. Sans ce bloqueur, nous ne pouvons pas distinguer les courants sortants endogènes de la lignée, principalement potassiques, et I_{CaL} .

	Concentration (mM)
CsCl	133
MgCl ₂	3
EGTA	5
HEPES	5
NaGTP	0,4
Na ₂ ATP	5
	pH ajusté à 7,30 avec CsOH

Tableau 3. Composition du MIP pour l'étude du courant calcique de type L dans les cardiomyocytes de rat.

	Concentration (mM)
NaCl	138
CsCl	20
CaCl ₂	2
HEPES	5
MgCl ₂	1
Glucose	5,5
	pH ajusté à 7,34 avec CsOH

Tableau 4. Composition du PSS pour l'étude du courant calcique de type L dans les cardiomyocytes de rat.

5.1.2 Le courant HEK293- I_{CaL} .

Les cellules HEK293- I_{CaL} exprimant de manière stable le canal calcique de type L, ont été acquises auprès de l'Université de Munich par l'Institut CERB (Centre de Recherche Biologiques) et ensuite données au laboratoire INSERM U1069. Ces cellules expriment la sous-unité $Ca_v1.2b$ (7,374 Kb ; GenBank : X55763), responsable du courant I_{CaL} de poumon de lapin, et la sous-unité régulatrice $Ca\beta 2a$ (3,061 Kb ; GenBank : X64297) issue du cœur de lapin.

Le muscle lisse du poumon et le ventricule expriment le canal calcique du type L, mais le courant I_{CaL} généré change dans ces deux tissus. Dans les deux tissus la sous-unité $\alpha 1$ est du type $Ca_v1.2$ et permet la formation du canal calcique du type L. Il existe six gènes qui codent pour le canal $Ca_v1.2$. Le gène qui code pour cette protéine dans ces deux tissus est le même, la forme $\alpha 1C$. Par contre dans les deux tissus on trouve deux isoformes différentes issues de splicing alternatif. Dans le cœur il y a la forme de la protéine $\alpha 1C-a$, dans le poumon la forme $\alpha 1C-b$, suite à modification post-transcriptionnelle. Welling et al. ont montré que ces deux isoformes ont une séquence en acide aminé très similaire, avec de faibles différences que dans quatre sites. Ce qui confère la même sensibilité pharmacologique à ces molécules testées du type qualitatif, avec une légère différence pour ce qui concerne la sensibilité (Welling et al., 1997). On peut donc considérer que la co-expression de ces deux protéines permet la traduction d'un canal ionique calcique et d'un courant I_{CaL} comparable à celui présent dans le ventricule cardiaque.

Pour les expériences de patch-clamp l'installation utilisée a été la même que celle pour les canaux potassiques (voir Ferro et al., 2012).

Le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, référence 12-604F, Lonza) enrichi avec 4.5 g/L de glucose, de la L-glutamine et d'acide pyruvique. Nous avons complété le milieu avec 10% v/v de SVF (Sérum de Veau Fœtal, référence DE14-801F, Lonza). Ce sérum est largement utilisé dans la culture cellulaire comme source riche, mais non contrôlée, en acides aminés, facteurs de croissance, hémoglobine, vitamines et AG. Il a été testé sur l'absence de mycoplasmes, bactéries et virus, il a une osmolarité d'environ 310 mOsm/kg et un pH d'environ 7.2. Les lignées HEK- I_{KS} ont été cultivées sans antibiotique. En effet, l'utilisation d'antibiotiques aurait pu moduler ou bloquer certains canaux ioniques. Les HEK293- I_{KR} et HEK293- I_{K1} ont en plus dans le milieu complet, 0.4 mg/ml de généticine (Invitrogen, Cergy pontoise, France). Dans le milieu complet des

HEK293- I_{CaL} , est ajouté 0.2 mg/ml de généticine et 0,1 mg/ml d'hygromycine B (Invitrogen, Cergy pontoise, France). Ces antibiotiques ont été utilisés de façon cyclique pour garder les plasmides de la transfection par pression de sélection.

Le type de pipettes utilisé pour les expériences de patch-clamp était semblable à celui utilisé pour les canaux potassiques, mais avec une résistance supérieure (4.5-6 $M\Omega$) pour diminuer la vitesse du run-down (perte de l'activité du canal en fonction du temps) (figure 16) et rendre possible l'étude de ce canal en configuration cellule entière.

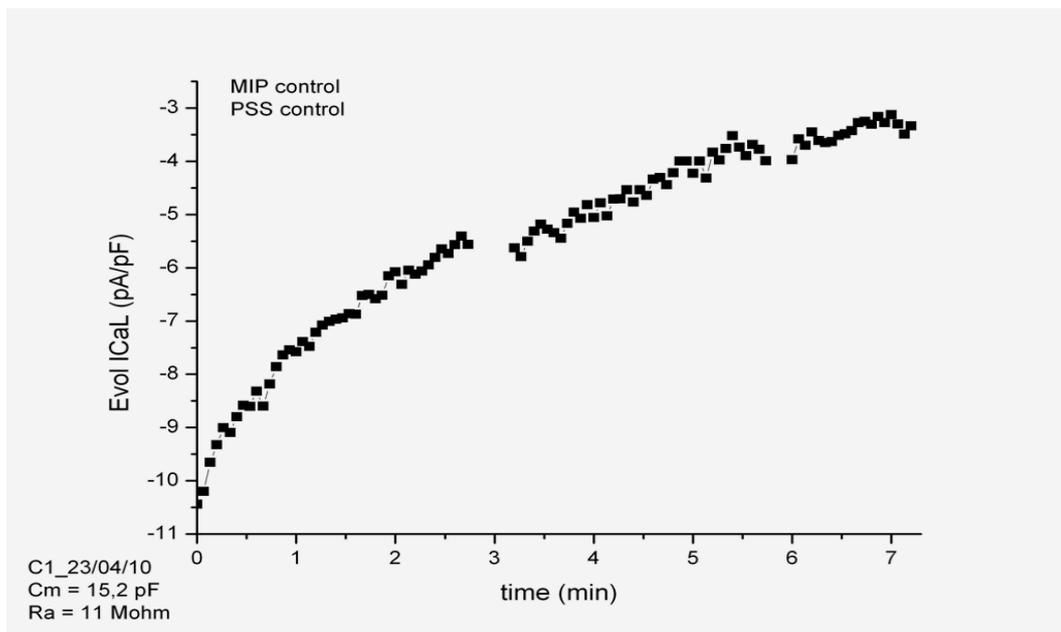


Figure 16. Évolution au cours du temps de l'amplitude de I_{CaL} d'une cellule HEK293- I_{CaL} représentative en condition de MIP et PSS contrôle.

Cette figure montre que, avec le protocole utilisé, nous avons une dizaine de minutes pour compléter les enregistrements. Le « run-down » est tel que le courant et le rapport signal/bruit deviennent trop petits pour l'analyse.

La mise au point des protocoles de stimulation pour le canal calcique du type L en plus des autres canaux a du tenir compte du « run-down ». Pour obtenir des résultats fiables il faut utiliser des protocoles d'une durée suffisamment longue pour permettre l'étude du canal, sans arriver à la perte totale d'activité du canal.

Pour mesurer l'effet des molécules d'intérêt nous avons observé les différences de vitesses du « run-down », d'amplitudes du courant, la courbe du courant relatif et celle d'inactivation et les constantes de temps d'inactivation en condition contrôle et en présence de LCAC et/ou d'AG dans la perfusion.

5.1.2.1 Protocole I_{CaL} 5s.

Comme pour les autres protocoles de stimulation utilisés, la fréquence d'échantillonnage était de 5 kHz et la fréquence de filtrage de 2 kHz; le potentiel de maintien était à -70 mV. Ce protocole prévoit une stimulation à +20 mV pendant 400 ms. A ce potentiel tous les canaux calciques d'intérêt sont activés et nous pouvons vérifier leur activité mesurant un courant de pic maximal. Après ce créneau nous revenons au potentiel de maintien de -70 mV (figure 17). La fréquence de stimulation est de 0.2 Hz. Nous stimulons la cellule toujours au même voltage (correspondant au maximum de courant sur la courbe I_{CaL} -V), pour vérifier son activité au cours du temps.

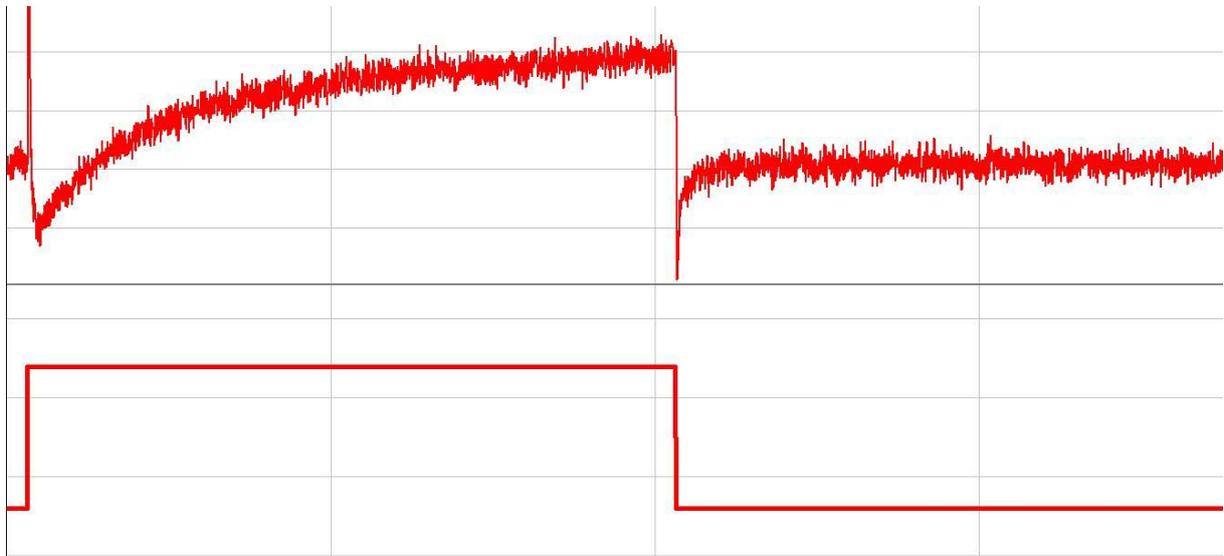


Figure 17. Exemple de tracé et schéma du protocole de stimulation « Depol ».

(Haut) Exemple de tracé du courant calcique de type L évoqué par le créneau de stimulation (en bas) à +20 mV. Ensuite on revient au potentiel de maintien à -70 mV.

5.1.2.2 Protocole courant-voltage « $I_{CaL} - V$ ».

Pour gagner du temps, nous avons créé un protocole de stimulation qui nous a permis de construire la courbe de courant relatif et de disponibilité du canal, grâce à la présence dans le protocole de plusieurs étapes. Ce protocole dit « double pulse » prévoit dans la première étape une série des 15 créneaux à différents voltages pour connaître la relation courant - voltage du canal. Ce premier créneau de voltage d'une durée de 400 ms est imposé à partir de -80 mV jusqu'à +60 mV avec un incrément de 10 mV à chaque nouvelle run de stimulation (figure 18). Cette première partie du protocole permet de construire la courbe $I_{CaL} - V$ courant en fonction du voltage.

Ensuite, pour construire la courbe de disponibilité du courant, le première créneau de voltage d'amplitude variable est suivi d'un deuxième créneau de voltage (inter-pulse) à -100 mV pendant 10 ms suivi d'un troisième créneau à +20 mV pendant 400 ms. Le courant mesuré dans ce étape nous permet de construire la courbe de disponibilité du canal. La fréquence de stimulation est de 0.2 Hz.

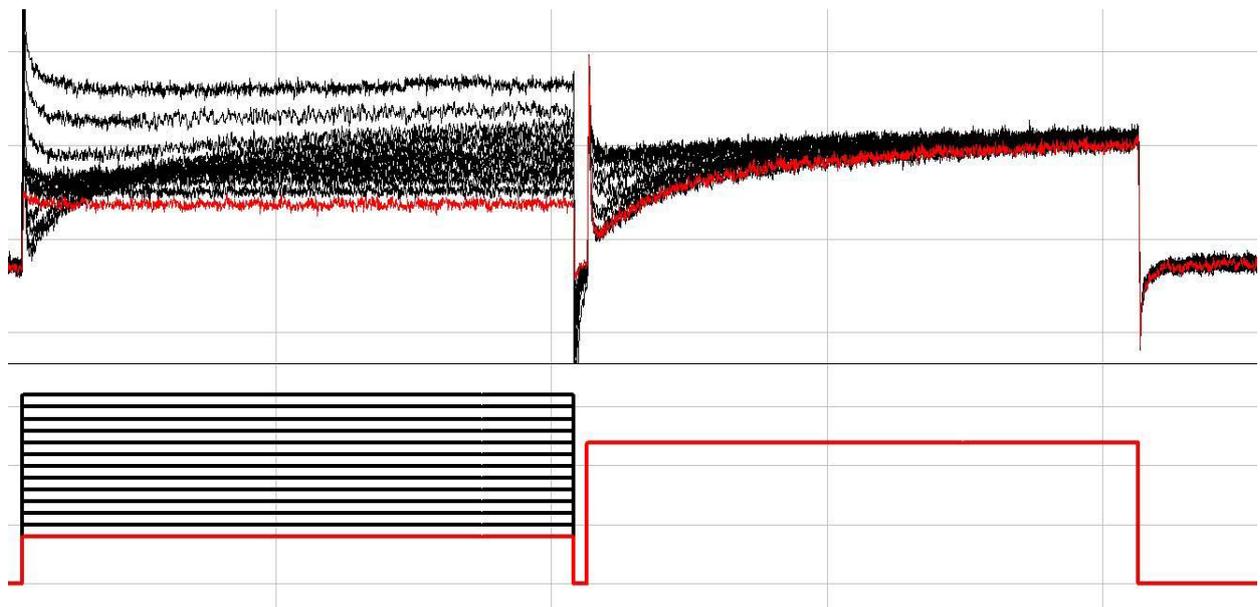


Figure 18. Représentation du tracé du courant HEK293- I_{CaL} obtenu grâce au protocole $I_{CaL} - V$.

(Haut) Ensemble de 15 tracés obtenus suite à la stimulation grâce au protocole schématisé en bas.

5.1.3 Courant I_{CaL} des cardiomyocytes

La série d'expériences réalisée avec les cardiomyocytes a été faite à Turin (Italie) dans le Laboratorio di Fisiologia Cellulare Cardiaca du Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi. L'installation de patch-clamp utilisée en Italie était différente de celle utilisée en France (voir Ferro *et al.*, 2012), avec des composants et des logiciels différents. Cependant la structure fondamentale reste la même.

La pipette doit être isolée des vibrations mécaniques et bruits électriques. Pour l'isolation mécanique, l'installation de patch-clamp repose sur une table anti-vibration (Ealing, USA en France) et l'isolation électrique est assurée par une cage de Faraday. Tous les matériaux métalliques y compris la cage de Faraday, la table anti-vibration et le microscope sont reliés à la terre.

La boîte de Pétri contenant les cellules est placée sur une plaque de plexiglas installée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon TE300, Japon en France et Zeiss, Allemagne, en Italie). La pipette de patch est approchée de la cellule isolée choisie grâce à l'utilisation d'un micromanipulateur de type mécanique (Narishige, Japon) ou piézoélectrique (MP225, Sutter Instrument Company, USA) en France ou mécanique en Italie (Narishige, Japon). Un macro- et micromanipulateur mécanique assure l'approche de la tête du système de perfusion au dessus de la cellule. Ce système est relié à plusieurs capillaires permettant la perfusion, par gravité, de différentes solutions expérimentales avec un débit réglable.

Dans la configuration voltage-clamp, la pipette permet à la fois d'imposer le potentiel et de mesurer les courants ioniques. A l'intérieur il y a une électrode d'argent chloruré qui sert à la fois d'électrode de stimulation et d'acquisition. La pipette est remplie de milieu intrapipette (MIP) et est installée sur le portoir de la tête de l'amplificateur de patch (« holder »). Le fil d'argent chloruré baigne dans le milieu intrapipette et assure la connexion électrique au système d'amplification et d'enregistrement. L'électrode de référence est composée d'argent chloruré (Ag / AgCl). Elle est plongée dans le milieu extracellulaire (à la limite de la boîte) de façon à fermer le circuit électrique.

Ces deux électrodes sont connectées à l'amplificateur qui assure l'amplification et la filtration courant-tension (Biologic RK-400, Biologic, France et Axopatch 200B, Axon Instruments, USA en France, Heka PC-9 en Italie). L'amplificateur est relié à une interface qui assure la conversion analogique/numérique (A/N) pour l'acquisition et

numérique/analogique (N/A) pour la stimulation (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA en France, Heka PC-9 en Italie). Le convertisseur A/N transmet le signal converti à un ordinateur (PC avec Microsoft Windows 98, Pentium en France, Apple PowerMac G4 en Italie).

Le signal est filtré par l'amplificateur à 2 kHz (filtre Butterworth 8 pôles dans l'amplificateur Biologic, Bessel 4 pôles avec l'amplificateur Axon et filtre Bessel 3 pôles avec l'amplificateur Heka). Le signal est échantillonné à une fréquence comprise entre 5 et 20 kHz selon le protocole utilisé.

Les expériences sont réalisées à température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

L'imposition du voltage comme la visualisation et l'enregistrement des courants sont assistés par ordinateur et pilotés par des logiciels. Avec l'amplificateur Biologic et Axon nous avons utilisé la suite pClamp 8.1 (Axon Instruments, USA). Elle comprend deux modules : Clampex qui permet la stimulation et l'acquisition et Clampfit qui permet l'analyse des données acquises. Les graphiques et courbes sont réalisés grâce au logiciel graphique Origin Microcal 10.1 (Microcal Software, USA).

Avec le system Heka nous avons utilisé le logiciel Heka PatchMaster 2.51 qui gère la stimulation, l'acquisition et d'analyse. Les courbes sont réalisées grâce au logiciel Kaleidagraph.

Une autre différence importante est qu'avec les systèmes Biologic et Axon plusieurs paramètres de stimulation et acquisition sont gérés grâce à l'amplificateur alors qu'avec le système Heka il y a un amplificateur « fermé » et tous les paramètres sont gérés grâce au logiciel PatchMaster.

5.1.3.1 Protocole I_{CaL} pour les cardiomyocytes.

Quand nous faisons du patch-clamp sur des cardiomyocytes il faut prendre en compte le fait que l'ensemble des canaux présents dans ces cellules est différents de celui des canaux ioniques endogènes présents dans les HEK293. Dans chaque modèle utilisé, pour que les tracés soient exploitables il faut que les courants endogènes n'apparaissent pas en même temps que le courant étudiés. Pour le modèle de HEK293- I_{CaL} , les courants endogènes potassique n'était pas présents dans les traces grâce à l'absence de K^+ dans les solutions intra-

et extracellulaire et à la présence de Tetra Ethyl Ammonium (TEA), un bloqueur des canaux potassiques voltage-dépendants.

Dans le modèle de cardiomyocytes, l'étude du courant I_{CaL} n'est permise que si le courant sodique Nav1.5 et les canaux potassiques repolarisants n'apparaissent pas. Pour que les courants potassiques venant de plusieurs canaux n'apparaissent pas, nous remplaçons le K^+ par du Cs^+ , un inhibiteur des canaux ioniques potassiques. Le protocole de stimulation électrique nous a permis d'enlever le courant sodique grâce à un créneau de potentiel préalable (pre – step) à -40 mV pendant 50 ms, qui active les canaux sodiques. Ceci entraîne aussi leur inactivation rapide, et ils restent inactivés jusqu'au le retour au potentiel de maintien au run suivant. Ce pre-pulse est suivi d'un créneau de 300 ms à +10 mV. Dans cette étape le courant mesuré ne provient que du canal calcique de type L car tous les canaux potassiques, normalement actifs à ce potentiel, sont bloqués par le césium présent dans la solution extracellulaire. Le potentiel de maintien est à -100 mV.

L'effet des AC sur I_{CaL} tient compte du « run-down ».

5.2 Résultats obtenus sur I_{CaL} exprimé dans les cellules HEK293. Acyl-carnitines vs acide gras.

Pour les expériences de patch-clamp sur le canal calcique, nous avons utilisé le C16-CAR à la concentration physiologique de $3 \mu\text{M}$ comme molécule représentative des LCAC. Nous avons comparé les effets obtenus en sa présence et en son absence dans la perfusion. L'installation a été la même que celle utilisée pour les canaux potassiques. Les paramètres mesurés pour un éventuel effet ont été la différence en amplitude, la vitesse du run-down, la différence dans les courbes de courant relative, la différence dans les courbes de disponibilité du canal et les deux constantes de temps d'inactivation.

Le C16-CAR à la concentration de $3 \mu\text{M}$ augmente le courant calcique après environ deux minutes de perfusion et stabilise le « run-down » ($n = 2$) comme montré en figure 19 (cellule représentative). Un effet similaire a été observé sur l'autre cellule.

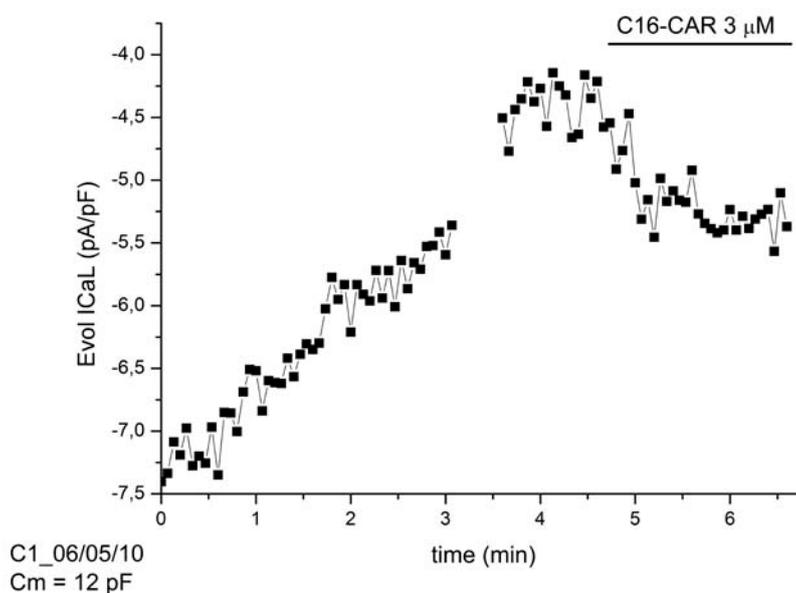


Figure 19. Effet de la perfusion de C16-CAR à $3 \mu\text{M}$. Cellule représentative.

Après avoir observé que le C16-CAR a un effet sur I_{CaL} , nous avons fait des expériences en ajoutant dans le PSS l'AG de même longueur de chaîne carbonée que le C16-CAR utilisé dans l'expérience précédente. Le but était de comprendre si l'effet de l'augmentation du courant était spécifique du C16-CAR. Dans le cas d'un effet non spécifique, augmentation de la fluidité membranaire par exemple, l'AG entrainera le même effet que le C16-CAR. Le protocole prévoit, après quelques minutes de perfusion en condition contrôle, la perfusion avec du C16-CAR suivi par la perfusion avec du C16-CAR + C16 méthyl ester (C16ME), les deux à la concentration de 3 μ M. Le C16-CAR après deux minutes de perfusion augmente I_{CaL} et stabilise son « run – down ». L'ajout de l'AG correspondant ne donne aucun effet additif ou synergique sur l'amplitude de courant *sensu stricto*. (n = 2). On peut même observer un léger effet de run – up, l'augmentation de l'activité du canal (figure 20).

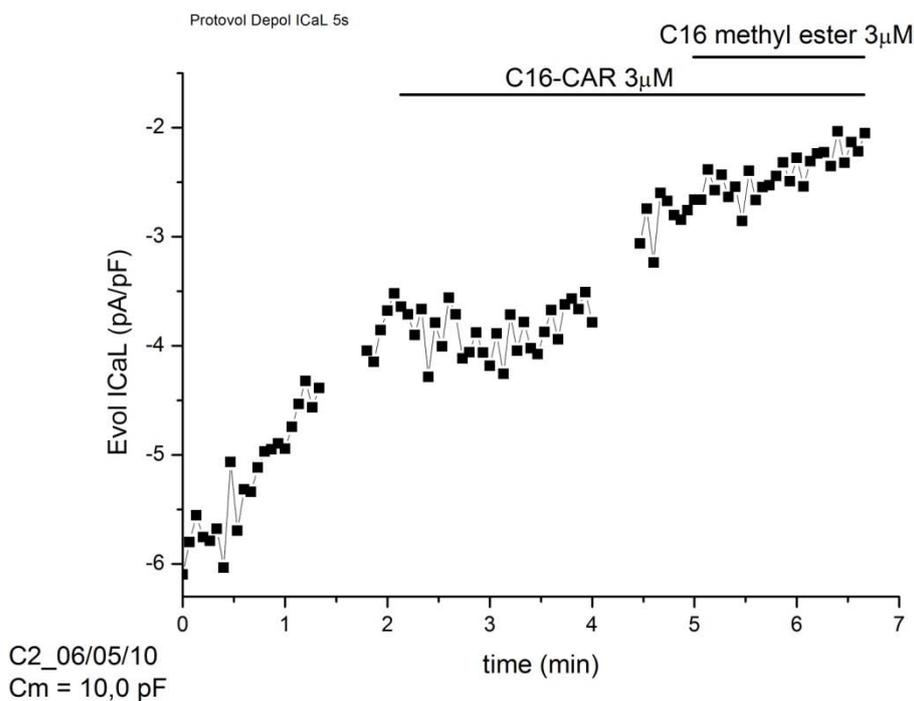


Figure 20. Effet du C16-CAR et C16-CAR + C16ME à 3 μ M chaque sur I_{CaL} . Pic de courant en fonction du temps. Cellule représentative.

Ensuite pour mieux comprendre la spécificité de cet effet nous avons inversé l'ordre de ces molécules dans la perfusion. Ainsi, nous avons d'abord perfusé avec du PSS contenant l'AG (C16ME) puis avec du PSS contenant C16ME et C16-CAR, les deux à la concentration de 3 μ M. Dans cette condition, l'AG augmente I_{CaL} et stabilise le « run – down » avec un léger effet de « run – up ». L'ajout de C16-CAR dans la perfusion n'engendre pas un effet additif d'augmentation du courant mais l'effet de stabilisation du « run – down » ne change pas. Avec le lavage avec du PSS, la perte d'activité du canal recommence. L'effet principale semble être encore la stabilisation du « run-down », n'importe pas si la première molécule ajoutée dans la perfusion soit le C16ME ou le C16-CAR (n = 2) (figure 21).

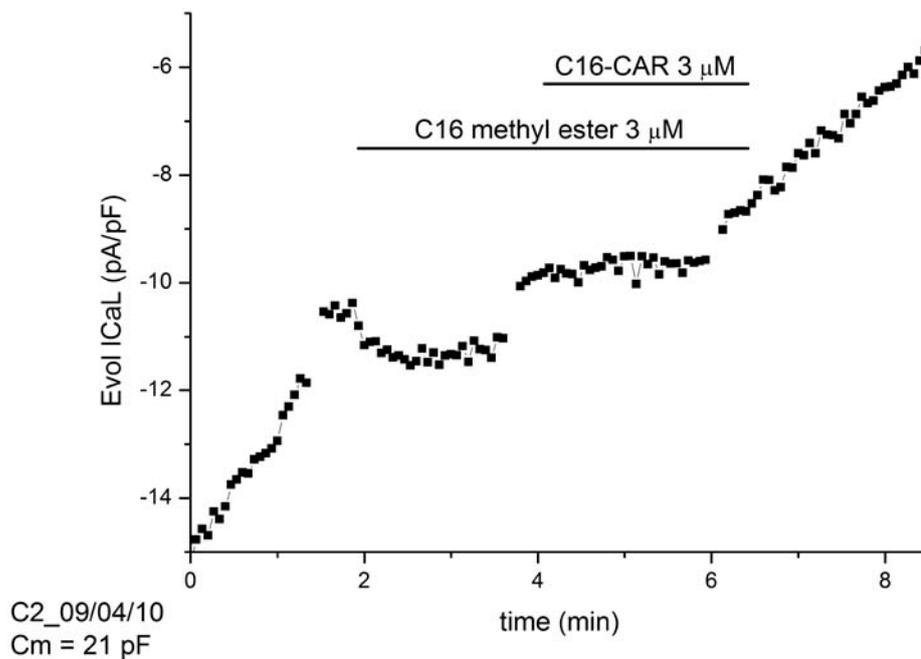


Figure 21. Effet du C16ME et C16ME + C16-CAR à 3 μ M chaque sur I_{CaL} . Mesure du pic de courant en fonction du temps. Cellule représentative.

Nous avons analysé plusieurs paramètres électrophysiologiques dans les différentes conditions pour mieux comprendre l'origine de cette augmentation du courant. Le premier paramètre analysé a été la « courbe du courant relatif » du canal, au travers le courant relativisé au courant maximal, et la courbe de disponibilité. On remarque que l'AG ou l'AC dans la perfusion ne changent pas ces courbes par rapport à la courbe obtenue en condition contrôle notamment en terme de dépendance au voltage (n = 4) (figure 22).

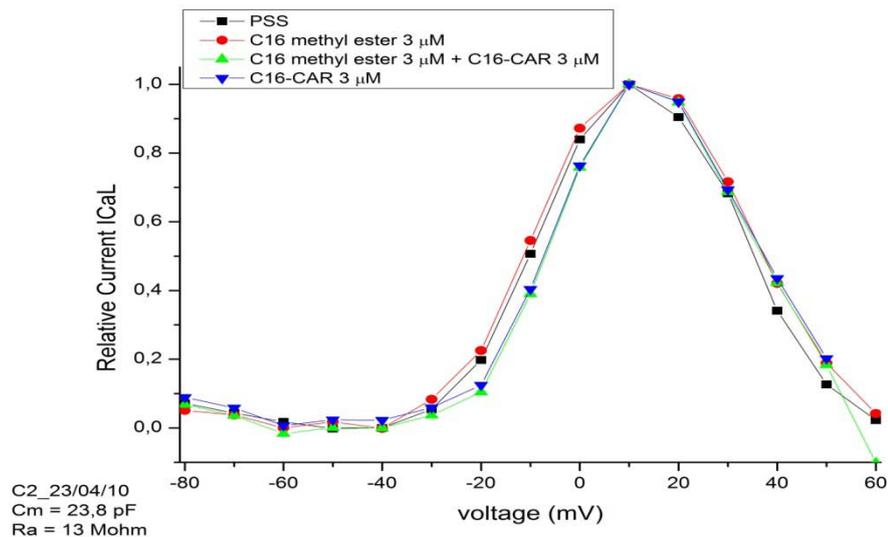


Figure 22. Courant relatif du canal $Ca_v1.2$ en condition contrôle (PSS), avec C16ME, avec C16ME + C16-CAR et avec C16-CAR. Cellule représentative, les autres cellules ont donnés résultats comparables.

Ensuite nous avons comparé les courbes de disponibilité dans les différentes conditions. L'analyse de ce paramètre n'a montré aucun changement ($n = 4$) (figure 23).

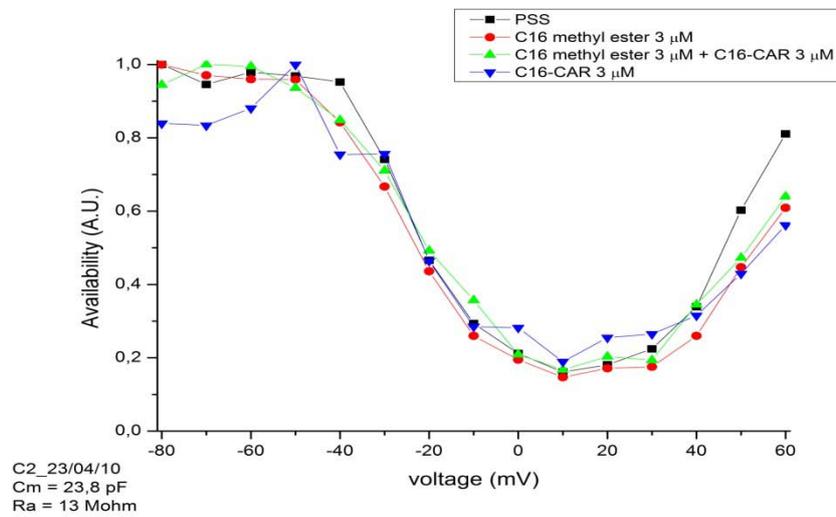


Figure 23. Courbes de disponibilité de I_{CaL} dans les différentes conditions. Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.

Le troisième paramètre mesuré a été la vitesse d'inactivation du canal, grâce à la mesure des deux constantes du temps. Nous avons vérifié que ces deux constantes (τ) ne sont pas modifiées par l'AG ou par l'AC, en aucune des conditions testées ($n = 6$) (figure 24 et 25, cellule représentative).

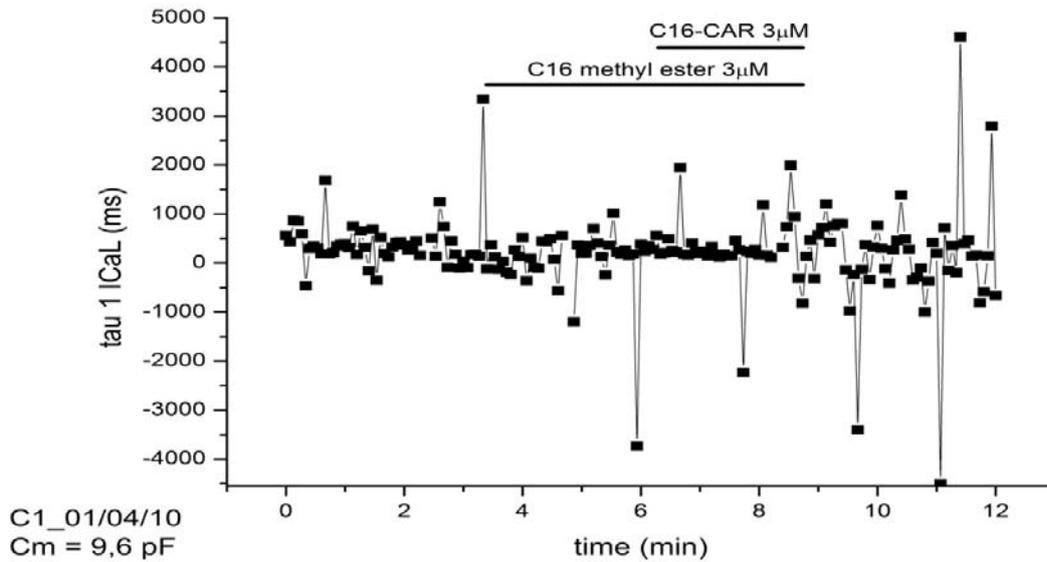


Figure 24. Mesure de la première constante de temps du I_{CaL} . Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.

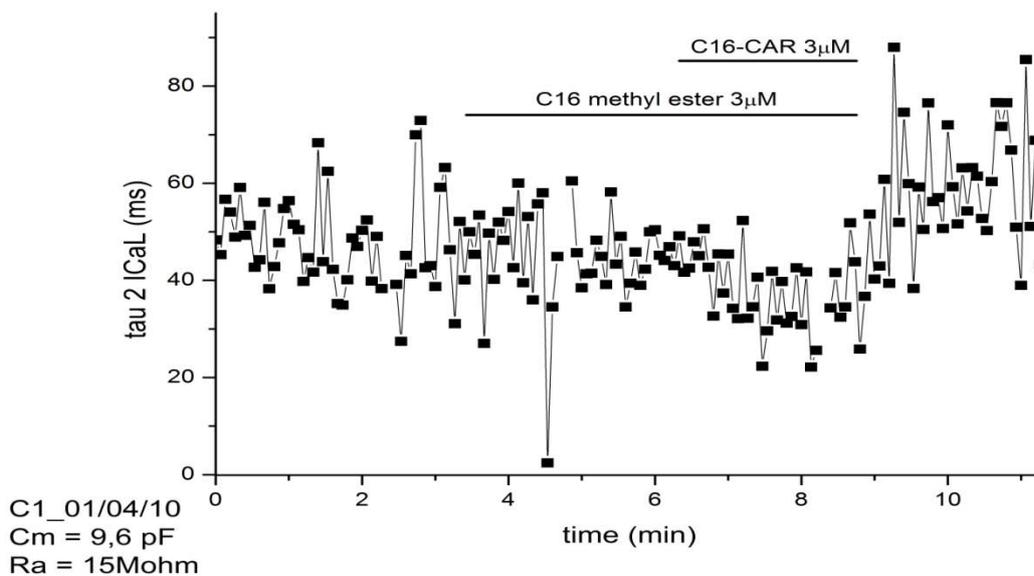


Figure 25. Mesure de la seconde constante de temps du I_{CaL} . Cellule représentative. Les autres cellules ont donné résultats comparables.

5.3 Résultats obtenus sur I_{CaL} exprimé de façon native dans des cardiomyocytes

Des expériences de patch-clamp ont également été réalisées sur des cellules natives isolées de cœur de rat. L'expérience prévoyait un protocole proche de celui utilisé pour les cellules HEK293- I_{CaL} : la perfusion avec C16-CAR, puis avec C16-CAR + C16ME à des concentration physiologiques.

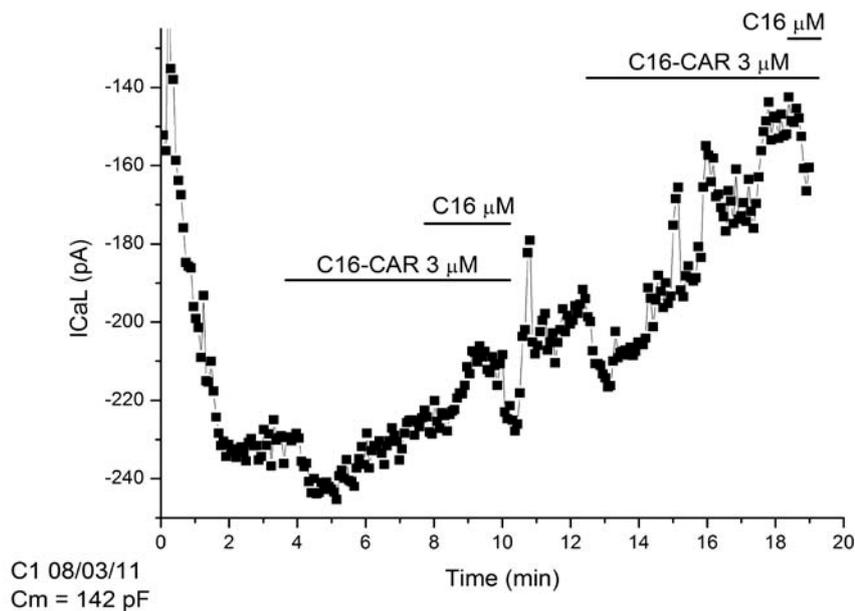


Figure 26. Évolution de l'effet sur I_{CaL} de C16-CAR et C16ME sur un cardiomyocyte de rat.

Le C16-CAR augmente le courant du canal calcique de 10-20%, et l'ajout de C16ME dans la perfusion entraîne une augmentation supplémentaire d'environ 10% (n = 3) (figure 2).

Pour des raisons logistiques, je n'ai pas pu étudier autant de cellules qu'il aurait fallu. Voici un des rares résultats que j'ai pu obtenir. L'effet d'augmentation de I_{CaL} que nous avons observé sur les cellules HEK- I_{CaL} n'est pas aussi visible et il est donc difficile de conclure.

6 Discussion

6.1 Les acyl-carnitines à chaîne longue régulent les canaux ioniques cardiaques.

6.1.1 Les acyl-carnitines à chaîne longue régulent le canal hERG de façon spécifique.

L'objectif de notre étude a été de tester la régulation du PA cardiaque par la carnitine et ses dérivés (AC). Nous avons donc vérifié avec la technique du patch-clamp les effets de ces molécules sur trois canaux potassiques impliqués dans la repolarisation cardiaque (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) et sur le canal calcique responsable de la phase de plateau du PA ventriculaire (I_{CaL}). Pour étudier la spécificité de ces effets, nous avons utilisé la carnitine libre (CAR), deux MCAC (octanoylcarnitine C8-CAR et décanoylcarnitine C10-CAR) et deux LCAC (palmitoylcarnitine C16-CAR et oleoylcarnitine C18-CAR). Pour le canal hERG, nous avons aussi utilisé deux AG à chaîne longue (palmitoyl-méthyl-ester (C16ME) et oleoyl-méthyl-ester (C18ME)). Nous avons utilisé plusieurs concentrations (comprises entre 0 et 30 μM) pour la carnitine et ses dérivés ; en ayant comme référence 3 μM (concentration physiologique).

Nous avons montré que les LCAC modulent le canal hERG de façon spécifique. Cette régulation a lieu du côté extracellulaire et ne concerne que les LCAC exclusivement. Les deux LCAC testés ont pour effet une augmentation du courant porté par le canal hERG et ce, pour la majorité des voltages physiologiques testés. Cette augmentation est liée à une ouverture de un courant de fenêtre (courant obtenu dans la zone de recouvrement entre les courbes d'activation et de disponibilité du courant). De manière inattendue, les effets observés avec ces deux LCAC ont des origines différentes. En effet, le C16-CAR provoque un déplacement de la courbe d'activation vers les potentiels plus négatives, sans aucun changement de la courbe d'inactivation. A l'inverse, le C18-CAR n'a aucun effet sur la courbe d'activation mais il décale la courbe d'inactivation vers les potentiels moins négatifs. Dans les deux cas la voltage-dépendance du canal est modifiée avec une ouverture de la courant de fenêtre. Un deuxième effet de l'application des LCAC sur le canal hERG, est l'accélération de la cinétique de désactivation. A la concentration de 3 μM , les LCAC accélèrent de 30% la

vitesse de désactivation par rapport à celle enregistrée en leur absence. Nous avons testé ces effets à la concentration de 1, 3, 10 et 30 μM et vérifié la dose-dépendance. Cette augmentation de cinétique atteint 70% avec la concentration de 30 μM . Aucun AC testé n'a eu d'effet si il était ajouté en intracellulaire, indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée et ce, jusqu'à 30 μM . Les effets potentiels sur le PA *in vivo* des deux LCAC par le hERG, ne sont pas facilement prédictibles étant donné que l'ouverture de la fenêtre du courant entraîne une augmentation du courant alors que l'augmentation de la vitesse de désactivation, provoque sa diminution. Pour mieux appréhender ces effets, une modélisation avec le logiciel JSim a été faite par Pierre Fontanaud de l'institut de Génomique Fonctionnelle (CNRS UMR 5203) et le Prof. Jean-Yves Le Guennec de l'unité INSERM 1046 de l'université de Montpellier-2. Le résultat de l'application de C18-CAR à la concentration physiologique de 3 μM comparé à son absence, montre un raccourcissement de la durée du potentiel d'action. Ce qui impliquerait que *in vivo*, si l'on comparait la condition pathologique (absence de LCAC) avec la condition physiologique, on s'attendrait à obtenir un PA rallongé.

Les expériences faites avec les AG libres C16 (acide palmitique) et C18 (acide stéarique), montrent que ces molécules augmentent le courant de fenêtre où un courant est visible de façon comparable à ce qui a été observé avec les AC correspondants, mais sans aucun effet sur la cinétique de désactivation. Ceci confirme la spécificité des effets des LCAC sur le canal, et non un effet qui serait lié à une augmentation de fluidité membranaire.

Les MCAC et la CAR n'ont aucun effet sur le canal hERG en extracellulaire, jusqu'à la concentration de 30 μM . En intracellulaire, aucune molécule testée n'a eu d'effet quelle que soit la concentration et ce indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée. Donc les LCAC modulent le canal hERG de façon spécifique de la longueur de la chaîne carbonée, seulement en extracellulaire et de façon dose-dépendante. La modélisation sur le logiciel JSim suggère que ces molécules entraînent une diminution de la durée du potentiel d'action ventriculaire suite à l'effet sur le canal hERG.

Nous avons aussi testé l'effet des LCAC sur les canaux Kv7.1/minK, Kir2.1 et Cav1.2/ β 2a. Ils ont été appliqués en extracellulaire à une concentration physiologique pour le canal Kv7.1/minK et jusqu'à 10 μM pour le canal I_{K1} . Ces molécules n'ont aucun effet dans ces conditions (Ferro et al., 2012). Ceci confirme la spécificité des effets des LCAC sur le canal hERG, puisque d'autres canaux potassiques ne sont pas modulés par les mêmes molécules, en particulier le canal Kv7.1/minK qui a une structure très proche du canal hERG.

6.1.2 Les acides gras et les acyl-carnitines à chaîne longue régulent le canal $Ca_v1.2$ *via* pourcentage de canaux fonctionnels sur la membrane.

Dans nos expériences de patch-clamp réalisées sur la lignée HEK293- I_{CaL} et sur les cardiomyocytes de rat nous avons obtenu des informations préliminaires sur l'effet des LCAC sur ce canal calcique (voir paragraphe 4.4 et 4.5), malgré un nombre des cellules insuffisant pour avoir des informations interprétables. Ces données montrent que le C16-CAR stabilise le « run-down », et apparemment il y a aussi une légère effet de « run – up » du courant I_{CaL} . En ajoutant l'AG correspondant (C16ME), on obtient le même type d'effet, même si de moindre intensité. Quand l'AG est ajouté pour première, on retrouve encore comme effet la stabilisation du « run-down », effet qui est trouvé encore avec l'ajout de la LCAC.

Cependant, il reste à déterminer si cette effet de stabilisation du « run-down » par les LCAC soit plus ou moins spécifique de l'AC ou de l'AG. Le même type d'expériences a été réalisé sur les cardiomyocytes et a confirmé la régulation du canal I_{CaL} par les LCAC observée sur les cellules HEK293. Par contre, l'effet de stabilisation du « run-down » dans le cardiomyocytes semble être moins efficace que celui que nous avons retrouvée dans les cellules épithéliales. Cette différence peut être expliquée soit par le fait d'avoir utilisé un modèle cellulaire différent, soit par la présence d'une ou plusieurs des sous-unité du canal calcique exprimées au sein des cardiomyocytes et pas dans les cellules HEK293. Cependant, les résultats obtenus sur le canal I_{CaL} restent à confirmer.

Nous avons analysé les différents paramètres électrophysiologiques dans les différentes conditions de perfusion pour comprendre l'origine de la stabilisation du « run-down » du courant. Si on considère la loi :

$$I_{Ca} = G_{Ca} * (E_m - E_{Ca})$$

où I_{Ca} est le courant calcique généré par la cellule

G_{Ca} est la conductance calcique globale de la cellule

E_m est le potentiel de membrane

E_{Ca} est le potentiel d'équilibre du calcium

La stabilisation de la perte du courant pourrait être le résultat du changement de la force électromotrice ($E_m - E_{Ca}$) ? Nous avons considéré la possibilité que l'effet obtenu par la LCAC et par le AGCL soit la conséquence de la variation de cette dernière du fait de la chélation des ions calcium par les molécules testées. Cette possibilité a été exclue parce que la carnitine dans l'AC est un zwitterion et que l'AG est un méthyle ester. Ceci ne rend pas disponibles les charges pour la chélation des ions calcium qui pourrait changer la force électromotrice. Et même si c'était le cas, la chélation aurait eu pour effet une diminution de la force électromotrice, avec pour conséquence une diminution du courant, contrairement à notre cas.

Étant donné que dans notre cas, le courant ne peut pas être dû à un changement de la force électromotrice, la stabilisation du « run-down » du courant ne peut être que le résultat du changement de la conductance calcique globale de la cellule (G_{Ca}).

Nous allons alors considérer la loi suivante :

$$G_{Ca} = \gamma_{Ca} * N * P_o$$

où G_{Ca} est la conductance calcique globale de la cellule

γ_{Ca} est la conductance calcique unitaire du canal $Ca_v1.2$

N est le nombre de canaux ioniques $Ca_v1.2$ présents sur la membrane cellulaire

P_0 est la probabilité que chaque canal soit ouvert à un voltage membranaire donné

Nous avons alors vérifié si un ou plusieurs de ces paramètres pouvant être changés par l'ajout de LCAC ou d'AGCL. Une possibilité pourrait être la variation de la probabilité d'ouverture du canal (P_0). La courbe normalisée du courant relatif et de disponibilité ne sont pas changées (voir paragraphe 5.4), que ce soit avec le LCAC, ou avec l'AG, même après lavage. Donc ce changement d'amplitude de courant ne peut pas avoir comme origine un changement dans la courant de fenêtre. Si à chaque voltage considéré, le pourcentage des canaux ouverts et disponibles est comparable dans les différentes conditions, on peut considérer que la probabilité d'ouverture (P_0) (ou pourcentage de canaux ioniques ouverts) ne soit pas changée par les molécules testées.

Nous avons alors mesuré cinétique du canal par la mesure de la vitesse de inactivation grâce aux deux constantes de temps. Cette analyse montre que ce paramètre ne change pas d'une conditions de perfusion à l'autre (voir paragraphe 5.4).

Le deuxième paramètre à considérer qui pourrait être la cause de la stabilisation du « run-down » de I_{CaL} est la conductance calcique unitaire γ du canal $Ca_v1.2$. Nous n'avons pas eu la possibilité de vérifier cette hypothèse, puisque la configuration de patch-clamp en cellule entière ne le permet pas. En effet, il aurait fallu utiliser des configurations adaptées pour l'étude en canal unitaire telles que : le patch-perforé ou l'outside-out. Par contre, malgré pour l'instant nous ne pouvons par exclure cette hypothèse, ça semble peu probable, étant donné que les molécules capables de changer la conductance unitaire des canaux ioniques sont rares.

Le dernière paramètre à considérer pour expliquer l'effet de stabilisation du « run-down » et légère « run – up » du I_{CaL} est l'augmentation du nombre de canaux ioniques fonctionnels présents sur la membrane cellulaire (N). L'effet apparait après une à deux minutes de perfusion, ce qui rend envisageable cette hypothèse. Le LCAC et l'AGCL pourraient augmenter rapidement l'adressage membranaire des canaux présents dans le cytoplasme. Ces molécules pourraient également permettre la récupération de la fonctionnalité des canaux ioniques qui l'ont perdue par le mécanisme qui amène au « run-down ». Ces deux voies ont comme conséquence une quantité plus importante de canaux fonctionnels au sein de la membrane. L'effet de molécules utilisées semble donc arrêter la « run-down », c'est-à-dire la perte de fonction du canal.

Le « run-down » est rapidement réversible quand les cellules sont lavés avec du PSS, donc les molécules utilisées pourraient agir de façon temporaire.

Le « run-down » est un phénomène répandu parmi les canaux calciques voltage-dépendants et c'est lié à la dialyse des certaines molécules cytoplasmiques. Le « run-down » n'a jamais montré être une voltage-dépendance ou être lié à la perte d'intégrité de la protéine canal. Le mécanisme de cette perte de fonction est spécifique pour chaque canal. Par exemple le canal calcique de type T ne montre pas de « run-down ». Le canal calcique de type N non plus, mais que si en présence d'ATP. Le canal calcique de type R des cellules des cheveux montre « run-down » mais le même canal dans les cellule du muscle lisse n'en pas affecté. Le canal calcique de type L subi un « run-down » important en configuration cellule entière ou en inside-out. Par contre les mécanismes impliqués ne sont pas claires. Parmi les hypothèses des mécanismes qui permettraient l'activité correcte du canal il y a la présence d'ATP, la phosphorylation/déphosphorylation et la protéolyse par des protéases dépendent du calcium, notamment la calpaine (Keplinger and Romanin, 2005). Si le C16-CAR et le C16ME stabilisent le « run-down » par stabilisation et peut être par augmentation du nombre des canaux ioniques fonctionnels sur la membrane. On doit donc soupçonner que l'AG ou son dérivé (AC) appliqué en extracellulaire soient capables d'interagir rapidement et temporairement avec la concentration plasmatique d'une ou plusieurs des molécules impliqués dans l'activité du canal calcique du type L pour garder l'activité de ce canal.

6.1.3 Modulation physiologique du canal hERG et du canal Ca_v1.2 par les acyl-carnitines à chaîne longue.

Le métabolisme des AG entraîne leur entrée dans le cytoplasme, leur activation en acyl-CoA, leur conversion en AC, leur entrée dans les mitochondries, leur reconversion en acyl-CoA ainsi que leur β -oxydation dans le cycle de Krebs (voir le paragraphe 1.2). La production des AC est strictement couplée à la demande énergétique, donc la concentration cytoplasmique sera faible (de l'ordre de la μM). La membrane mitochondriale interne et la membrane plasmique sont perméables aux AC produits dans la mitochondrie, ce qui permet leur diffusion dans le cytoplasme puis dans le sang. Ici nous pouvons retrouver des AC avec des chaînes carbonées de longueurs variables : de l'acétyl-carnitine (C2-CAR) jusqu'à l'oléoyl-carnitine (C18:1-CAR) ou plus. Leur présence relative reflète leur concentration dans les mitochondries au cours des différentes étapes de la β -oxydation. Dans le sang, les SCAC et MCAC sont présents en concentrations faibles, de l'ordre de 0.1-1 μM , alors que les LCAC comme le C16-CAR et C18-CAR sont présents à des concentrations plus élevée, de l'ordre de 2-3 μM (Cavedon et al. 2005; Osorio 2007).

En condition physiologique il y a donc une concentration sanguine de 2-3 μM de chaque LCAC, comparable à celle que nous avons utilisée comme référence pour nos expériences. Puisque les LCAC modulent le canal hERG de façon dose-dépendante *in vitro*, on s'attend à observer une modulation physiologique permanente chez un individu sain *in vivo*. La repolarisation cardiaque pourrait donc être physiologiquement modulée par la présence des LCAC, dérivés du métabolisme physiologique des AG. L'effet hypothétique *in vivo* de cette modulation s'approcherait de celui obtenu avec la modélisation réalisée à l'aide du logiciel JSim (Ferro et al., 2012), et correspondrait donc à un raccourcissement de la durée du PA ventriculaire. Nous avons donc démontré pour la première fois qu'il existe un lien entre activité électrique cardiaque et métabolisme énergétique pour le canal hERG.

6.1.3 Confirmation de l'hypothèse du lien entre concentrations pathologiques des LCAC et troubles du rythme.

Dans l'introduction nous avons parlé d'une série de maladies dont l'origine est différente mais qui possèdent toutes comme effet secondaire un désordre du métabolisme des AG. Ceci entraîne une augmentation ou une diminution de la concentration de plusieurs dérivés du métabolisme des AG (voir paragraphes 1.3.2 et 1.3.3). Dans toutes ces maladies, le facteur commun est la concentration plasmatique des LCAC éloignée des valeurs physiologiques : soit pathologiquement élevée, soit très faibles. Les manifestations cliniques possibles communes à ces maladies seraient les troubles du rythme et la mort subite. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires ne sont pas encore élucidés. Plusieurs hypothèses ont été émises, et parmi celles-ci l'hypothèse la plus probable serait que le facteur commun à ces maladies (un taux pathologique de LCAC) puisse perturber l'activité électrique cardiaque de façon importante, jusqu'à ce que se déclenchent des arythmies cardiaques. Plusieurs équipes ont montré qu'il existe un effet d'une LCAC (le plus souvent le C16-CAR), à une seule concentration arbitraire pathologiquement élevée, sur l'activité d'un canal ionique cardiaque. Nous avons démontré ici pour la première fois que plusieurs LCAC, qui ont en commun le fait d'être à chaîne longue, peuvent moduler l'activité d'au moins deux canaux ioniques cardiaques et ce, de façon spécifique et dose-dépendante. Ceci implique également que plus la maladie et le désordre du métabolisme des AG secondaires sont sévères, plus l'augmentation (ou diminution, selon la maladie) des LCAC est probable, plus le dérangement électrophysiologique sera important, et plus le risque de troubles du rythme sera élevé. De plus, toutes les études réalisées jusqu'ici concernent l'effet sur un seul canal ionique d'un seul type de LCAC à une seule concentration élevée de LCAC. Ces études ont permis d'avoir une idée sur les effets de ces LCAC, mais l'extrapolation vers l'*in vivo* est difficile. Nous avons comparé les effets de différentes concentrations pathologiques (élevées ou basses) à ceux d'une valeur physiologique. Nous avons ainsi démontré que non seulement l'augmentation pathologique comme l'absence des LCAC (situations retrouvées en cas de syndrome primaire de déficience en carnitine) peuvent entraîner des changements importants dans l'activité électrique cardiaque pouvant participer au déclenchement des troubles du rythme. La modulation des LCAC sur le canal potassique hERG et calcique Cav1.2/ β pourrait expliquer en partie le lien de cause à effet entre concentration pathologique des LCAC et troubles du rythme.

Concernant l'ischémie cardiaque, Schwartz et Wolf ont comparé les caractéristiques des ECG et les événements de mort subite entre un groupe de patients ayant survécu à l'infarctus cardiaque et un groupe contrôle (Schwartz and Wolf 1978). Le paramètre examiné a été le QTc, c'est-à-dire la durée de l'espace entre le pic de l'onde Q et la fin de l'onde T dans l'ECG, corrigé par le rythme cardiaque selon la formule de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$). Ils ont montré que le groupe de patients avait un QTc significativement plus long que celui du groupe contrôle (436 ± 25 vs. 418 ± 15 ms). Le groupe de patients a été suivi pendant sept ans, et au cours de cette période, 55% d'entre eux sont décédés de mort subite, contre 2% (un seul cas) au sein du groupe contrôle. Les auteurs ont mesuré que dans le groupe de patients, le sous-groupe de patients décédés par mort subite présentaient un QTc significativement plus long que ceux du sous-groupe de patients ayant survécus (443 ± 27 vs. 429 ± 20 ms). Dans le groupe contrôle, aucun patient n'avait de QTc ayant une durée supérieure à 440 ms, sauf le seul patient qui est décédé de mort subite pendant la période de suivi (Schwartz and Wolf 1978). Cet ensemble de résultats montre que chez les personnes déjà atteintes d'infarctus du myocarde, le fait d'avoir un QTc prolongé par rapport à la population saine, serait une condition favorable au déclenchement des arythmies cardiaques.

La variation d'expression des canaux ioniques (type et degré d'expression) dans les différents tissus du ventricule (épicarde, midmyocarde ou endocarde) a comme conséquence la génération des PA hétérogènes dans la forme et dans la durée dans ces tissus (figure 27) (Antzelevitch 2007; Roden et al. 2002).



Figure 27. PA de myocytes isolés à partir de l'épicarde (Epi), du midmyocarde (M) et de l'endocarde (Endo) d'un ventricule gauche de chien.

D'après Antzelevitch, 2007.

Ces différences de forme et de durée du PA au niveau des trois types cellulaires, sont à l'origine du gradient de dispersion transmurale du voltage dans la paroi du ventricule. Ce phénomène est à l'origine de l'onde T observée dans l'ECG (Antzelevitch 2007, 2008).

Les effets des LCAC à concentration pathologique (élevée ou basse) sur les canaux ioniques cardiaque, pourraient amplifier cette hétérogénéité et avoir comme effet l'augmentation de cette dispersion transmurale. Cette condition est considérée comme étant responsable du déclenchement des troubles du rythme retrouvés dans le syndrome de QT long, dans le syndrome de QT court et dans le syndrome de Brugada (BrS). La durée du trait ST et plus récemment, la forme et la durée entre la fin de l'onde T et de son pic (Tpic – Tend), sont utilisées comme index de la dispersion transmurale. Ces deux durées, quand elles sont sensiblement augmentées ou diminuées, sont le signe d'une dispersion transmurale pathologiquement élevée. Or, une élévation de cette dispersion transmurale trop importante pourrait déclencher des troubles du rythme. Par exemple, certaines formes de QT long sont associées à rallongement de la durée du PA (DPA) dans les cellules M. De même, certaines formes de BrS sont associées à un raccourcissement de la DPA dans l'épicarde du ventricule gauche (Antzelevitch, 2008). On remarque donc que toute modification de la durée du PA est pathologique.

Un taux pathologique de LCAC, pourrait participer aux troubles du rythme suite à une augmentation de la dispersion transmurale. Cette augmentation serait éventuellement renforcée si il existe déjà un substrat comme un QT court ou un QT long plus ou moins important.

6.1.4 Lien entre métabolisme énergétique et activité électrique cardiaque.

En condition physiologique, 60 à 90% de l'ATP utilisé par les cardiomyocytes est obtenu *via* la β -oxydation des AG dans les mitochondries. Ce métabolisme entraîne la production des AC qui diffusent en partie dans le sang, dont la majeure partie est constituée des LCAC, particulièrement le C16 :0-CAR et le C18 :1-CAR (Cavedon *et al.*, 2005 ; Osorio et Pourfarzam, 2007). Nous avons démontré que ces molécules peuvent moduler l'activité électrique du cœur. Donc toute modification de la concentration sanguine des LCAC, pourrait changer de façon plus ou moins importante la DPA ventriculaire. Ces modifications peuvent être la conséquence d'un métabolisme des AG augmenté ou diminué (par exemple métabolisme cardiaque pendant- ou post-infarctus, diabète) ou d'une maladie de la β -oxydation des AG (déficit primaire systémique de la carnitine, ou enzymes de la CPT-I ou II, VLCAD). Dans ces situations la demande en ATP ne change pas par rapport à la condition physiologique, mais la différence réside dans la quantité de substrats disponible ou dans la capacité que possèdent les cellules de les métaboliser. Un lien direct entre métabolisme énergétique et activité électrique a été démontré ici, ce qui implique que le moindre changement du premier aura des conséquences directes et rapides sur le deuxième.

6.2 Limites de cette étude.

Notre étude a montré un important couplage entre métabolisme énergétique et activité électrique du cœur. Pourtant certaines limites apparaissent. Ces aspects n'affaiblissent pas les résultats, mais leur analyse peut aider à mieux comprendre nos résultats et éventuellement comprendre comment aller plus loin.

6.2.1 Les protéines transfectées

La plupart des canaux ioniques sont constitués d'une sous-unité principale α qui est le pore de sélectivité et qui permet le passage des ions dans les deux sens de la membrane cellulaire. Les quatre canaux ioniques testés, *in vivo* ont tous une structure quaternaire qui diffère plus ou moins de la(les) protéine(s) transfectée(s) dans la lignée HEK293 :

- Le canal hERG transfecté n'avait que la sous-unité α (Kv11.1). *In vivo* cette protéine est associée à la sous-unité minK et parfois à la sous-unité MiRP1 (Gutman et al. 2005).
- Le canal I_{KS} transfecté avait les sous-unités α et minK (Kv7.1/minK). *In vivo* ce canal ionique s'associe aussi à la sous-unité MiRP2 (Gutman et al. 2005).
- Le canal Kir2.1 transfecté n'avait que la sous-unité α . *In vivo* le canal I_{K1} peut aussi être un hétérotétramère Kir2.1/Kir2.2 et s'associer avec plusieurs protéines, notamment PSD-95, SAP-97 et AKAP79 (Kubo et al. 2005).
- Le canal $Ca_v1.2$ transfecté avait les sous-unités $\alpha1C$ et $\beta2$. *In vivo* ce canal ionique s'associe également avec les sous-unités $\alpha2$ et δ (W. A. Catterall et al. 2005; W. A. Catterall 2011, Roden et al. 2002). Apparemment la sous-unité γ n'est pas exprimée dans le cœur (Roden et al. 2002).

Les canaux ioniques sont souvent associés à des sous-unités auxiliaires ou secondaires, dont la fonction n'est pas toujours bien connue. Ils peuvent moduler l'adressage, l'ancrage membranaire, la conductance et les propriétés pharmacologiques du canal.

Dans nos expériences, nous avons toujours utilisé des lignées HEK293 transfectées avec la sous-unité α . Dans deux cas, les cellules ont également été transfectées avec une sous-unité β (minK pour le canal Kv7.1 et β_2 pour le canal Ca_v1.2).

Nous ne pouvons pas exclure que si le canal hERG ou le canal Ca_v1.2 avait eu ses sous-unités nous n'aurions pas vu un effet différent. Nous ne pouvons pas exclure non plus qu'un effet soit possible avec les LCAC sur les canaux ioniques « complets » des toutes leurs sous-unités où nous n'avons vu aucun effet.

6.2.2 Le modèle cellulaire HEK293

La lignée cellulaire utilisée dans nos expériences est la lignée HEK293 ou HEK, Human Embryonic Kidney. C'est une lignée de cellules épithéliales immortalisée. Les HEK sont capables de la plupart des modifications post-traductionnelles, y compris l'acquisition de la conformation tri-dimensionnelle permettant de générer des protéines fonctionnelles et matures (Thomas and Smart 2005). Cette lignée est largement utilisée dans les expériences de patch-clamp pour sa fiabilité. Nous savons que les canaux ioniques de ces cellules ont une structure quaternaire correcte. Cependant, les expériences menées sur ces cellules épithéliales transfectées avec des canaux ioniques cardiaques ont un degré de fiabilité moins important que si elles avaient été réalisées sur des cardiomyocytes. En effet, les cellules HEK293 ne possèdent pas l'ensemble des interactions protéiques et moléculaires présentes dans le cytosol des cardiomyocytes. Ces interactions pourraient être à l'origine des différences que l'on aurait pu obtenir si ces mêmes expériences avaient été répétées dans les cardiomyocytes.

6.2.3 Résultat de la modélisation

La modélisation du PA ventriculaire (Ferro *et al.*, 2012) a été réalisée grâce aux effets du C18-CAR sur la protéine hERG, mesurés *in vitro*, en tenant compte du fait que ces molécules n'avaient aucun effet sur le canal Kv7.1/minK ni sur le canal Kir2.1. Le résultat est un raccourcissement du PA ventriculaire. Cette simulation nous donne une idée du type d'effet qu'on pourrait observer *in vivo*.

Ce résultat est à prendre avec mesure, du fait que les aspects qualitatif et quantitatif de celui-ci pourraient être affectés par certains aspects. En effet, l'étude de chaque canal, *in vitro* ou *in silico* (hERG seulement), ne prennent pas en compte les conditions retrouvées *in vivo*. Par exemple, comme expliqué dans le paragraphe 6.2.1 « les protéines transfectées », les protéines testées *in vitro* n'avaient pas toutes les sous-unités retrouvées *in vivo*. Ces sous-unités pourraient être à l'origine d'une éventuelle différence de résultats qui entrainerait un résultat différent dans la simulation.

De plus, nous avons observé une stabilisation du courant généré par le canal Cav1.2/ β 2, après administration du C16CAR et C16ME. Ce résultat n'apparaît pas dans notre modélisation. Si ces résultats étaient confirmés à l'avenir, la conséquence de l'administration de C18-CAR pourrait être un rallongement de la phase du plateau dans le PA ventriculaire. Cet effet serait contraire à celui obtenu grâce à la modulation des LCAC sur le hERG. Dans le cas où l'effet sur le canal calcique du type L serait intégré en plus de celui observé sur le canal hERG, il serait difficile de prévoir le résultat de la modélisation.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure l'effet potentiel des LCAC sur d'autres canaux ioniques cardiaques non testés, comme le I_{Na} ($Na_v1.5$), I_{Kur} ($K_v1.5$), I_{K-Ach} , I_{K-ATP} et I_{to} ($K_v4.3$ ou $K_v1.4$).

6.3 Perspectives

6.3.1 Autres canaux ioniques cardiaques

Suite aux observations décrites dans le paragraphe 6.2.3 (limites du résultat de la modélisation) il serait intéressant de mener une série d'expériences de patch-clamp sur des cellules HEK transfectées avec les canaux ioniques cardiaques non testés. Si nous considérons les canaux ioniques cardiaques, ceux qui en étant mutés peuvent donner un QT long ou un QT court, sont le $K_v11.1$ (hERG), le $K_v7.1$, le $K_{ir}2.1$, le $Na_v1.5$, le $Ca_v1.2$ ou leurs sous-unités (Hedley *et al.*, 2009). Ces sont donc les canaux qui une fois mutés, peuvent être la cause d'altérations des propriétés électriques et du trouble du rythme. Parmi ces canaux, le $Na_v1.5$ est le seul que nous n'avons pas encore testé. Ca sera donc la première cible à tester pour étudier l'éventuel effet des LCAC sur d'autres canaux.

Il est probable que les LCAC aient des effets sur d'autres canaux ioniques cardiaques qui, au moins pour l'instant, n'ont pas encore été associés au syndrome du QT long ou du QT court. Nous pourrions donc considérer comme prochaines cibles les canaux I_f , I_{K-ATP} , I_{K-Ach} et I_{to} .

6.3.2 Compléter l'étude des effets des LCAC sur I_{CaL} dans les cardiomyocytes

Nous avons montré sur les cellules HEK293 que les LCAC modulent le canal $Cav1.2/\beta$ du côté extracellulaire. Quand la cellule est perfusée avec des LCAC à concentration physiologique (3 μM), ce molécule stabilise le « run – down » avec un léger effet de « run – up » du courant généré par ce canal. Si la cellule est perfusée juste après avec l'AG correspondant, il n'y a pas retrouvé le même effet mais de moindre intensité. Si on inverse l'ordre de la perfusion de ces molécules, on retrouve les mêmes effets : l'AG ajouté en premier stabilise le « run – down ». Ensuite, la perfusion avec des LCAC a le même type d'effet mais encore de moindre intensité.

La même expérience réalisée sur des cardiomyocytes a donné un résultat similaire des LCAC. Cependant, l'effet de stabilisation du « run – down » semble être moins important que dans les cellules HEK293-I_{CaL}. Il faut tenir compte du fait que ces données soient préliminaires. Il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons dans le modèle HEK-I_{CaL} et sur les cardiomyocytes pour avoir des informations plus claires.

Le fait d'inverser l'ordre d'ajout des molécules dans la perfusion sert à vérifier l'éventuelle spécificité des effets. En effet, il pourrait exister des effets non spécifiques tels que la modification de la fluidité membranaire par l'intégration des AG et dérivés.

6.3.3 Current-clamp sur cardiomyocytes

Jusqu'ici nous avons parlé des résultats obtenus, ou d'éventuelles expériences à réaliser afin d'étudier les effets des AC sur un canal à la fois, qu'il soit transfecté sur une lignée cellulaire, ou présent dans les cardiomyocytes. L'étape suivante, pour se rapprocher de l'effet que les AC pourraient avoir *in vivo*, serait de réaliser des expériences en patch-clamp sur des cardiomyocytes mais cette fois-ci en utilisant la configuration de « current-clamp ». De cette façon, nous pourrions tester l'effet des AC sur un PA dans un modèle de cellules musculaires cardiaques de rat. Ce sont des cellules très proches, d'un point de vue électrophysiologique, de celles de l'homme, sauf concernant la durée du PA. L'avantage de ce modèle est de posséder l'ensemble des canaux ioniques cardiaques exprimés au sein d'un seul système cellulaire, avec leurs sous-unités et les protéines cytoplasmiques avec lesquelles elles peuvent interagir.

6.3.4 Souris *jvs* ou animaux traités au mildronate

Notre objectif est de vérifier l'effet des AC sur l'activité électrique cardiaque, et surtout de comparer l'effet de l'absence de ces molécules par rapport à la condition physiologique. Pour réaliser des expériences *in vivo*, il faut avoir des modèles dans lesquels la concentration sanguine des AC est proche de zéro, la retrouvée dans le PSCD chez l'homme (voir paragraphe 1.3.3.1 dans l'Introduction).

Pour arriver à la condition d'absence de CAR et de ses dérivés *in vivo*, il faut arrêter les deux voies permettant son introduction et sa synthèse. La première voie, l'alimentation, est facilement gérable : en effet, dans une animalerie, la nourriture peut être strictement contrôlée. Il suffit donc de contrôler la composition de la nourriture mise à disposition des animaux pour empêcher l'introduction de la carnitine par voie orale. Dans ces conditions (comme chez les végétaliens chez l'homme), le foie doit augmenter la quantité de carnitine synthétisée à partir de la méthionine pour compenser la non-introduction par le régime (Tein, 2003). A ce niveau nous pouvons agir de deux façons : soit empêcher que l'organisme concentre la carnitine dans la cellule et permettre l'élimination de celle-ci dans l'urine, soit inhiber la synthèse endogène. La première méthode est permise par l'utilisation de souris *jvs*, alors que la seconde consiste à traiter des souris ou d'autres animaux de souche sauvage (« wild-type ») avec du mildronate.

La souris *jvs* (Juvenile Visceral Steatosis) a été décrite pour la première fois en 1988 par Koizumi et al. (T. Koizumi et al. 1988). Ils ont décrit une mutation spontanée de la souche de souris C3H-H-2, caractérisée par une hypertrophie cardiaque et une stéatose des organes viscéraux, en particulier du foie et des reins. La cause est une mutation faux-sens du gène *SCL22A5*, qui code pour la protéine membranaire OCTN2 au niveau du septième passage transmembranaire. Avec cette protéine non-fonctionnelle, la carnitine sanguine n'est pas concentrée dans les muscles, et celle synthétisée par le foie ou introduite par l'alimentation est éliminée dans les urines. Les AGCL ne peuvent pas être métabolisés et ils s'accumulent donc dans les organes, causant des stéatoses hépatique et cardiaque. Le taux de carnitine dans le foie est alors équivalent à 3% du taux physiologique, et la concentration dans les autres tissus resterait similaire. La seule façon d'avoir une concentration sanguine non négligeable est la forte administration par voie orale de carnitine. Cependant, si les souris ont un régime normal, celui-ci et la synthèse endogène ne seront pas capables de compenser la perte de carnitine dans les urines. Les souris *jvs* sont caractérisées par une hypertrophie cardiaque et des dépôts de graisse dans certains organes comme le cœur, les muscles, le foie et les reins. Si elles ne sont pas traitées, les souris homozygotes (*jvs*^{-/-}) décèdent avant le sevrage, à la 5^{ème} semaine. Les hétérozygotes (*jvs*^{+/-}) présentent seulement une légère stéatose cardiaque et hépatique, mais les concentrations plasmatiques de CAR et d'AC sont très faibles ce qui n'empêche pas leur survie (Tein, 2003). Une première expérience pourrait prévoir d'utiliser des protocoles de télémétrie chez des souris hétérozygotes (*jvs*^{+/-}). L'idée étant de vérifier d'éventuels différences de l'ECG entre les souris wild-type et les souris *jvs*^{+/-} ou *jvs*^{+/-}. Les résultats

attendus seraient des PA différents de part leur vitesse et/ou leur forme dans les deux cas. Ce qui confirmerait *in vivo* la modulation des canaux ioniques cardiaques par les LCAC.

Le second moyen pour vérifier l'effet de l'absence des LCAC *in vivo* est l'utilisation du mildronate. Le mildronate (3-(2,2,2-triméthylhydrazine)propionate, THP) est un analogue de la γ -butyrobétaine. Au niveau du foie, cette molécule entraîne une inhibition compétitive de l'enzyme qui permet la biosynthèse de la carnitine à partir de la butyrobétaine. La présence de mildronate dans le foie empêche donc la formation de la carnitine. De plus, l'alimentation des rongeurs pouvant être totalement contrôlée, on peut éviter l'apport exogène de carnitine. Chez les végétaliens, le foie arrive à compenser le manque de carnitine exogène en synthétisant quasiment la totalité de la carnitine nécessaire. Or, avec le mildronate, cette voie métabolique est bloquée. L'administration orale de THP en quelques jours chez les rats a pour conséquence la diminution de concentration de carnitine et de LCAC dans les cellules et dans le sang, et ce, sans diminution de l'ATP disponible (Simkhovich et al. 1988). De cette façon, en contrôlant l'alimentation et l'administration du mildronate nous pouvons réduire la concentration sanguine de CAR et de LCAC jusqu'à atteindre une concentration quasi nulle. Cette condition s'approche de celle présente chez les souris *jvs*. Une fois ces rongeurs traités avec le THP, il faudrait réaliser des expériences de télémétrie chez ces animaux afin de vérifier d'éventuelles différences par rapport aux animaux contrôles.

Concernant le choix des animaux à utiliser dans le premier cas il faut forcément utiliser des souris étant donné que la souche *jvs* est unique, donc qu'il n'existe pas d'autres animaux disponibles. Pour la seconde série d'expériences, le rat est préférable à la souris du fait qu'il possède un potentiel d'action plus long. De plus, chez le rat, le canal correspondant à hERG (le mERG pour la souris et le rERG pour le rat) serait présent en plus grande quantité, ce qui impliquerait un éventuel effet des LCAC plus évident chez les rats que chez les souris.

6.4 Conclusions

Plusieurs maladies entraînent des désordres du métabolisme des AG à différents niveaux. Les conséquences de ces désordres sont soit une augmentation soit une diminution du taux d'AG et de leurs dérivés circulants, notamment les AC (les acyl-CoA peuvent également augmenter mais ils restent confinés à l'intérieur de la cellule). Ces mêmes maladies sont aussi associées aux perturbations électriques de l'activité cardiaque, à des troubles du rythme et à la morte subite. Le changement de concentration des AG et surtout des AC, en particulier des LCAC, a été soupçonné comme étant la cause de ces dérangements électriques. Plusieurs études ont montré que les LCAC et les AG à concentration élevée peuvent moduler les canaux ioniques cardiaques. Toutes ces études ont utilisé une seule, voire deux LCAC. Les concentrations utilisées dans ces études, ne permettent aucune comparaison avec l'effet d'une concentration comparable à la situation physiologique : les concentrations utilisées correspondent à des concentrations pathologiquement élevées *in vivo*. Jusqu'ici aucune étude n'a évalué l'effet des LCAC sur les canaux ioniques cardiaques repolarisants.

Nous avons testés l'effet des plusieurs AG, d'AC de différentes longueurs de la chaîne carbonée et de la carnitine libre, sur les trois canaux ioniques cardiaques potassiques repolarisants (I_{KR} , I_{KS} et I_{K1}), et sur le canal calcique du type L (I_{CaL}) qui permet la phase du plateau dans le ventricule. Les concentrations utilisées ici ont été comprises entre 0 et 30 μM , avec comme référence la concentration physiologique de 3 μM . Nous avons montré que les AC modulent le canal hERG de façon spécifique. Cette régulation a lieu du côté extracellulaire et ne concerne que les LCAC exclusivement. Les LCAC ont deux effets opposés sur hERG: une ouverture du courant de fenêtre et une augmentation de la vitesse de la cinétique de désactivation. Aucun AC testé n'a eu d'effet s'il était ajouté en intracellulaire, indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée. La CAR et les MCAC n'ont eu aucun effet en extracellulaire et ce, jusqu'à 30 μM . Les mêmes expériences réalisées sur I_{KS} et sur I_{K1} ont montré que les LCAC ne modulent pas ces canaux. Enfin, l'étude des effets des C16-CAR et de l'acide palmitique sur le courant I_{CaL} dans la lignée HEK293- I_{CaL} et dans des cardiomyocytes de rat, ont montré que le canal $\text{Ca}_v1.2$ est modulé par ces molécules à la concentrations de 3 μM , entraînent une stabilisation du « run-down » *in vitro*. Les résultats

obtenus sur ce dernier canal et l'hypothèse formulée, restent à confirmer avec des expériences complémentaires et *via* l'utilisation d'autres techniques d'électrophysiologie.

Ces résultats montrent qu'en condition physiologique il y a une modulation permanente du canal hERG par les LCAC. Il existe un lien strict entre le métabolisme énergétique et l'activité électrique cardiaque. Dans certaines maladies (comme l'infarctus, le diabète et certaines maladies génétiques touchant la β -oxydation des AG) il y a une importante augmentation de LCAC circulants. Dans d'autres états pathologiques (notamment la déficience primaire systémique en carnitine) la concentration de ces molécules est très faible. Les deux conditions pathologiques sont associées à des perturbations de l'activité électrique cardiaque, à des troubles du rythme et à la mort subite. La régulation par les LCAC du canal hERG que nous avons démontrée ici et peut être celle du canal I_{CaL} , pourraient participer au dérangement électrique à l'origine du déclenchement de troubles du rythme cardiaque.

Cette étude a permis d'améliorer la compréhension de la régulation physiologique des canaux impliqués dans la repolarisation et la phase de plateau du PA cardiaque par les LCAC. De plus, le mécanisme d'action de ces molécules soupçonnées être impliquées dans certaines situations pathologiques a été en partie élucidé. Ceci permettrait d'envisager des études *in vitro* ultérieures, et pourquoi pas *in vivo*, qui pourraient à terme mener au développement de thérapies visant à améliorer les signes et symptômes provoqués par les perturbations électriques observées dans certaines maladies.

Bibliographie

- An, Ding, and Brian Rodrigues. 2006. "Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291(4):H1489–506. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751293>).
- Antzelevitch, Charles. 2007. "Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes." *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 9 Suppl 4:iv4–15. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2365914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Antzelevitch, Charles. 2008. "Drug-induced spatial dispersion of repolarization." *Cardiology journal* 15(2):100–21. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2497005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Baker, Herman, Barbara DeAngelis, James Orlando, and Joaquin Correia. 2005. "Cardiac carnitine leakage is promoted by cardiomyopathy." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 21(3):348–50. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797677>).
- Barhanin, J., F. Lesage (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**(6604): 78-80.
- Baum, Seth J. 2012. "EPA and DHA: Distinct yet essential n-3 fatty acids." *Journal of clinical lipidology* 6(5):477. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009786>.
- Bers D.M. 2002 "Cardiac excitation - contraction coupling" *Nature* 415: 198-205.
- Bonnefont, J P et al. 1999. "Carnitine palmitoyltransferase deficiencies." *Molecular genetics and metabolism* 68(4):424–40. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607472>).
- Bonnet, D et al. 1999. "Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children." *Circulation* 100(22):2248–53. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577999>).
- Catterall, William A, Edward Perez-reyes, Terrance P Snutch, and Joerg Striessnig. 2005. "International Union of Pharmacology . XLVIII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels." *57*(4):411–425.
- Catterall, William a. 2011. "Voltage-gated calcium channels." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(8):a003947. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21746798>).
- Cavedon, Catia Testa et al. 2005. "Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry." *Clinical chemistry* 51(4):745–52. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708951>).

- Clancy, C E, and Y Rudy. 2001. "Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death." *Cardiovascular research* 50(2):301–13.://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334834).
- Collins, A., H. Chuang (1997). Scanning mutagenesis of the putative transmembrane segments of Kir2.1, an inward rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5456-60.
- Corr, P B, J E Saffitz, and B E Sobel. 1987. "Lysophospholipids, long chain acylcarnitines and membrane dysfunction in the ischaemic heart." *Basic research in cardiology* 82 Suppl 1:199–208. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3311006>).
- Corr, P B, and K A Yamada. 1995. "Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis." *Herz* 20(3):156–68. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543431>).
- DaTorre, S D, M H Creer, S M Pogwizd, and P B Corr. 1991. "Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in the ischemic heart." *Journal of molecular and cellular cardiology* 23 Suppl 1:11–22. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2038071>).
- Danthi, Sanjay J, Judith a Enyeart, and John J Enyeart. 2005. "Modulation of native T-type calcium channels by omega-3 fatty acids." *Biochemical and biophysical research communications* 327(2):485–93. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629140>).
- Ferro, Fabio et al. 2012. "Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel." *PloS one* 7(7):e41686. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3404973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Feuvray, D, J a Idell-Wenger, and J R Neely. 1979. "Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes." *Circulation research* 44(3):322–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/761313>).
- Ford, D a, X Han, C C Horner, and R W Gross. 1996. "Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool." *Biochemistry* 35(24):7903–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672492>).
- Giles, W R, and Y Imaizumi. 1988. "Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells." *The Journal of physiology* 405:123–45. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1190968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Guizy, Miriam, Cristina Arias, Miren David, Teresa González, and Carmen Valenzuela. 2005. "{Omega}-3 and {omega}-6 polyunsaturated fatty acids block HERG channels." *American journal of physiology. Cell physiology* 289(5):C1251–60. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987770>).

- Gutman, George A et al. 2005. "International Union of Pharmacology . LIII . Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels." 57(4):473–508.
- Haruna, Tetsuya et al. 2000. "Alteration of the membrane lipid environment by L - palmitoylcarnitine modulates K ATP channels in guinea-pig ventricular myocytes." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 441(2-3):200–207. (<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s004240000428>).
- Hedley, Paula L et al. 2009. "The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update." *Human mutation* 30(11):1486–511. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19862833>).
- Hell JW 2010 "Beta-adrenergic regulation of the L-type Ca²⁺ channel Ca(V) 1.2 by PKA rekindles excitement" *Sci Signal* 28:3(141).
- Hendrickson, S C, J D St Louis, J E Lowe, and S Abdel-aleem. 1997. "Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion." *Molecular and cellular biochemistry* 166(1-2):85–94. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046024>).
- Horiuchi, M et al. 1993. "Cardiac hypertrophy in juvenile visceral steatosis (jvs) mice with systemic carnitine deficiency." *FEBS letters* 326(1-3):267–71. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325377>).
- Horn, Wade D Van, Carlos G Vanoye, and R Charles. 2012. "NIH Public Access." 21(2):283–291.
- January CT and Riddell JM 1989 "Early afterdepolarisations : mechanism of induction and block. a role for L-type Ca²⁺ current". *Circ Res* 64(5(977-90).
- Jogl, Gerwald, Yu-Shan Hsiao, and Liang Tong. 2004. "Structure and function of carnitine acyltransferases." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033:17–29. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591000>).
- Jones, Mark G, C Stewart Goodwin, Saira Amjad, and Ronald A Chalmers. 2005. "Plasma and urinary carnitine and acylcarnitines in chronic fatigue syndrome." 360:173–177.
- Karpati, G et al. 1975. "The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features." *Neurology* 25(1):16–24. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/234182>).
- Kodde, Izaäk Frederik, Johan van der Stok, Ryszard T Smolenski, and Jan Willem de Jong. 2007. "Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference." *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 146(1):26–39. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081788>).
- Koizumi, A et al. 1999. "Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary

- systemic carnitine deficiency.” *Human molecular genetics* 8(12):2247–54. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545605>).
- Koizumi, T, H Nikaido, J Hayakawa, A Nonomura, and T Yoneda. 1988. “Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2(0) strain of mouse with similarities to Reye’s syndrome.” *Laboratory animals* 22(1):83–7. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3352223>).
- Koumi, S, C L Backer, and C E Arentzen. 1995. “Characterization of inwardly rectifying K⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.” *Circulation* 92(2):164–74. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600647>).
- Kubo, Yoshihiro et al. 2005. “International Union of Pharmacology . LIV . Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels.” 57(4):509–526.
- Lippiat, Jonathan D. 2008. “Whole-cell recording using the perforated patch clamp technique.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 491:141–9. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18998090>).
- Liu, Qi-yi, Robert L Rosenberg, Chapel Hill, and North Carolina. 1996. “Activation and Inhibition of Reconstituted Cardiac L-Type Calcium Channels by Palmitoyl-L-carnitine prior to any evidence of irreversible membrane damage , suggesting biochemical alterations in Ca²⁺ / influx in cardiac myocytes and help control the streng.” 258:252–258.
- Longo, Nicola, Cristina Amat di San Filippo, and Marzia Pasquali. 2006. “Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle.” *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 142C(2):77–85. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2557099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lopaschuk, G D et al. 1994. “Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia.” *American heart journal* 128(1):61–7. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8017285>).
- Lopatin, a N, and C G Nichols. 2001. “Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1).” *Journal of molecular and cellular cardiology* 33(4):625–38. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273717>).
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J Marx AR, Kass RS 2002 "Requirement of a macromolecular signaling complex for beta-adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel" *Science* 295 (5554)496-9.,
- Mazzini, M et al. 2011. “Primary carnitine deficiency and sudden death: in vivo evidence of myocardial lipid peroxidation and sulfonylation of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase 2.” *Cardiology* 120(1):52–8. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116472>).
- Osorio, J H. 2007. “Determinación de valores normales de acilcarnitinas en una población infantil sana como herramienta diagnóstica de errores hereditarios de la β-oxidación

mitochondrial de los ácidos grasos DETERMINATION OF NORMAL ACYLCARNITINE LEVELS IN A HEALTHY PEDIATRIC.” 67(6):548–552.

- Ramsay, Rona R, and Victor a Zammit. 2004. “Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease.” *Molecular aspects of medicine* 25(5-6):475–93. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363637>).
- Rasmussen, Jan, Olav W Nielsen, Allan M Lund, Lars Køber, and Høgni Djurhuus. 2012. “Primary carnitine deficiency and pivalic acid exposure causing encephalopathy and fatal cardiac events.” *Journal of inherited metabolic disease*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566287>).
- Rijlaarsdam, Renske S et al. 2004. “Ventricular fibrillation without overt cardiomyopathy as first presentation of organic cation transporter 2-deficiency in adolescence.” *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 27(5):675–6. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125729>).
- Rinaldo, P, C A Stanley, B Y Hsu, L A Sanchez, and H J Stern. 1997. “Sudden neonatal death in carnitine transporter deficiency.” *The Journal of pediatrics* 131(2):304–5. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290621>).
- Roden, Dan M, Jeffrey R Balsler, Alfred L George, and Mark E Anderson. 2002. “Cardiac ion channels.” *Annual review of physiology* 64:431–75. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826275>).
- Sato, T, M Arita, and T Kiyosue. 1993. “Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes.” *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 7 Suppl 3:575–84. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251427>).
- Sato, T, T Kiyosue, and M Arita. 1992. “Inhibitory effects of palmitoylcarnitine and lysophosphatidylcholine on the sodium current of cardiac ventricular cells.” *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 420(1):94–100. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1553264>).
- Saudubray, J M et al. 1999. “Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients.” *Journal of inherited metabolic disease* 22(4):488–502. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407781>).
- Schwartz, P. J., and S. Wolf. 1978. “QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction.” *Circulation* 57(6):1074–1077. (<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.57.6.1074>).
- Shumilina, Ekaterina et al. 2006. “Cytoplasmic accumulation of long-chain coenzyme A esters activates KATP and inhibits Kir2.1 channels.” *The Journal of physiology* 575(Pt 2):433–42. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1819462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Simkhovich, B Z et al. 1988. "3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties." *Biochemical pharmacology* 37(2):195–202. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3342076>).
- Spiekerkoetter, Ute. 2010. "Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening." *Journal of inherited metabolic disease* 33(5):527–32. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20449660>).
- Spooner, P M. 2008. "Sudden cardiac death: influence of diabetes." *Diabetes, obesity & metabolism* 10(7):523–32. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451424>).
- Stanley, Charles a. 2004. "Carnitine deficiency disorders in children." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033:42–51. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591002>).
- Stanley, William C, and Margaret P Chandler. 2002. "Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions." *Heart failure reviews* 7(2):115–30. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988636>).
- Stanley, William C, Erinne R Dabkowski, Rogerio F Ribeiro, and Kelly A O'Connell. 2012. "Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection." *Circulation research* 110(5):764–76. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383711>).
- Stanley, William C, Fabio A Recchia, and Gary D Lopaschuk. 2005. "Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart." 1093–1129.
- Su, Xiong, Xianlin Han, David J Mancuso, Dana R Abendschein, and Richard W Gross. 2005. "Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics." *Biochemistry* 44(13):5234–45. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15794660>).
- Taegtmeyer, Heinrich, and Kalpana Ballal. 2006. "No low-fat diet for the failing heart?" *Circulation* 114(20):2092–3. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101867>).
- Tein, I. 2003. "Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects." *Journal of inherited metabolic disease* 26(2-3):147–69. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12889657>).
- Thomas, Philip, and Trevor G Smart. 2005. "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51(3):187–200. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862464>).
- Venetucci L., Denegri M., Napolitano C., Priori S.G. 2012 "Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias". *Nat Rev Cardiol*9(10)561-75.
- Wanders, R J et al. 1999. "Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation." *Journal of inherited metabolic disease* 22(4):442–87. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407780>).

Welling, Ludwig, Zimmer, Klugbauer, Jlokerzi, Hofmann 1997. "Alternatively spliced IS6 segment of the alpha1C gene determine the tissue specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth and cardiac L-type Ca²⁺ channels. Circulation Research 81: 526 - 532.

Ziolo, Mark T, Korie L Sondgeroth, Carol H Harshbarger, Jacquelyn M Smith, and Gordon M Wahler. 2001. "Effects of arrhythmogenic lipid metabolites on the L-type calcium current of diabetic vs . non-diabetic rat hearts." 169–175.

Ouvrages imprimés consulté

Keplinger Klaus JF and Romanin Christoph (2005). "The run – down phenomenon of Ca²⁺ channels". D'après "Voltage – gates calcium channels", January 2005, Edited by Gerald Zamponi.

Sites web consultés

Acetyl-CoA – Wikipedia. [référence du 02 octobre 2012]

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Acetyl-CoA-3D-balls.png> URL du site

Nom du site. [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le site a été consulté), URL du site

Patch – perforé. http://mitochondria.inje.ac.kr/01_intro/img/06_1_img04.gif 22 novembre 2012.

Fabio FERRO

Régulation des canaux ioniques cardiaques par les acyl-carnitines

Résumé

Plusieurs maladies entraînent soit une augmentation soit une diminution du taux des acides gras (AG) et de leurs dérivés circulants, notamment les acyl-carnitines (AC). Ce changement a été soupçonné comme étant la cause de importants dérangements électriques. Nous avons montré que les AC à chaîne longue (LCAC) du côté extracellulaire modulent le canal hERG de façon spécifique, modulant sa amplitude de courant et sa cinétique. Aucun AC testé n'a eu d'effet en intracellulaire. La CAR et les MCAC n'ont eu aucun effet. Les AC ne modulent pas les courants I_{KS} et I_{K1} . Le canal $Ca_v1.2$ est modulé par C16-CAR et le C16 dans la lignée HEK293- I_{CaL} et dans des cardiomyocytes de rat. En condition physiologique il existe donc un lien strict entre le métabolisme énergétique et activité électrique cardiaque qui entraîne une modulation permanente du canal hERG par les LCAC. La régulation par les LCAC du canal hERG et peut être celle du canal I_{CaL} , pourraient participer au dérangement électrique à l'origine du déclenchement de troubles du rythme cardiaque retrouvé dans certaines maladies.

Publication : Ferro F., Ouillé A., Tran T.-A., Fontanaud P., Bois P., Babuty D., Labarthe F., Le Guennec J.-Y. 2012. "Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel." *PloS one* 7(7):e41686.

Mots clés : électrophysiologie cardiaque, métabolisme lipidique, troubles du rythme, canaux ioniques, acides gras, acyl-carnitine.

Abstract

Several diseases can cause either an increase or a decrease in the rate of fatty acids (FAs) and their derivatives circulating, including acyl-carnitines (AC). This change is suspected as being the cause of major cardiac electrical perturbations. We have shown that long-chain AC (LCAC) modulate specifically by the extracellular side the hERG channel, regulating its current amplitude and kinetics. All AC tested had no effect when applied intracellularly. Carnitine and medium chain AC had no effect on hERG. LCAC does not modulate I_{K1} and I_{KS} . $Ca_v1.2$ channel is modulated by C16 and C16-CAR in line HEK293- I_{CaL} and rat cardiomyocytes. In physiological conditions there exists a strict link between energy metabolism and cardiac electrical activity which causes a permanent modulation of hERG channel by the LCAC. Regulation by the LCAC of the hERG channel and maybe I_{CaL} , could participate in the electrical disturbance causing the onset of cardiac arrhythmia found in certain diseases.

Keywords: Cardiac Electrophysiology, lipid metabolism, arrhythmias, ion channels, fatty acids, acyl-carnitine.