



HAL
open science

Influence des ratios de co-expression précis Cx43 : Cx45 sur la formation des canaux de jonction et leurs propriétés électriques

Sebastien Dupuis

► **To cite this version:**

Sebastien Dupuis. Influence des ratios de co-expression précis Cx43 : Cx45 sur la formation des canaux de jonction et leurs propriétés électriques. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0375 . tel-01502845

HAL Id: tel-01502845

<https://theses.hal.science/tel-01502845>

Submitted on 6 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale Sciences et Vie de la Santé

Spécialité Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie

Par Sébastien Dupuis

Influence des ratios de co-expression précis Cx43:Cx45 sur la formation des canaux de jonction et leurs propriétés électriques

Sous la direction de : Dr Thomas Desplantez

Soutenue le 16 décembre 2016

Membres du jury :

M. Bois Patrick	Professeur des universités, Université de Poitiers	Président
M. Giaume Christian	Directeur de recherche, Collège de France	Rapporteur
Mme Guibert Christelle	Chargée de recherche, CRCTB – INSERM U1045	Examinatrice
M. Hosy Eric	Chargé de recherche, Université de Bordeaux - IINS	Invité
M. Desplantez Thomas	Chargé de recherche, IHU LIRYC	Directeur de thèse

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	10
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES ABREVIATIONS	20
RESUME	23
INTRODUCTION	26
I/ ANATOMIE ET CONDUCTION CARDIAQUE	28
a) Anatomie cardiaque et circulation	28
b) Système de conduction cardiaque	29
c) Le potentiel d'action cellulaire.....	30
i. Définition	30
ii. Initiation du potentiel d'action cardiaque.....	31
iii. Potentiel d'action auriculaire et ventriculaire.....	32
d) Vitesses de propagations.....	34
e) Disques intercalaires.....	35
i. Desmosomes	36
ii. Fasciae adherens	36
iii. Jonctions communicantes	36
iv. Interactions moléculaires : le connexome	37
II/ JONCTIONS COMMUNICANTES, CANAUX DE JONCTION ET CONNEXINES.....	38
a) Nomenclature	38
b) Gènes des connexines	38
c) Topologie membranaire	40
d) Oligomérisation des connexines	41
e) Adressage à la membrane	45
f) Formation des canaux de jonctions	46
g) Profils d'expressions cardiaques.....	48
h) Configurations et nomenclatures des canaux de jonctions.....	49
i) Modifications post-traductionnelles.....	50
i. Phosphorylations.....	50
ii. Ubiquitylation.....	52
iii. Acétylation.....	52
iv. Autres modifications post-traductionnelles.....	52

j)	<i>Voies de dégradation des connexines</i>	53
i.	voie lysosomale	53
ii.	voie protéasomale.....	53
III/	PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DES CANAUX DE JONCTIONS.....	54
a)	<i>Couplage électrique intercellulaire G_j,0</i>	54
b)	<i>Sensibilité des canaux de jonction au potentiel de jonction</i>	55
i.	Définition	55
ii.	Dépendance au potentiel de jonction.....	55
1.	Canaux homotypiques.....	56
2.	Canaux hétérotypiques	56
3.	Canaux hétéromériques	59
iii.	Cinétiques de désactivation	61
1.	Définition	61
2.	Canaux homotypiques.....	64
3.	Canaux hétérotypiques	64
4.	Canaux hétéromériques	65
5.	Mécanismes impliqués dans la désactivation des canaux de jonctions.....	65
iv.	Cinétiques de restitution.....	67
c)	<i>Conductances unitaires</i>	67
i.	Définition	67
ii.	Canaux homotypiques.....	67
iii.	Canaux hétérotypiques	68
iv.	Canaux hétéromériques	69
OBJECTIFS		71
MATERIELS ET METHODES		74
I/	CULTURE CELLULAIRE.....	75
a)	<i>Lignée cellulaire</i>	75
b)	<i>Système ecdysone</i>	76
II/	CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE	79
a)	<i>ARN interférence (ARNi) anti-Cx43</i>	79
b)	<i>Electroporation</i>	80
c)	<i>Immunofluorescence</i>	81
d)	<i>Western blot</i>	83
e)	<i>Electrophorèse</i>	84
III/	ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES	87
a)	<i>Double voltage clamp</i>	87
b)	<i>Potentiel de jonction (V_j)</i>	90
IV/	PROPRIÉTÉS ÉLECTRIQUES.....	91
a)	<i>Couplage électrique intercellulaire</i>	91
b)	<i>Dépendance au V_j</i>	92
c)	<i>Cinétiques de désactivation</i>	92

d) <i>Cinétiques de restitution</i>	93
e) <i>Conductances unitaires</i>	94
V/ SIMULATION DE LA DÉPENDANCE AU VJ.....	95
VI/ ACQUISITION DES DONNÉES ET ANALYSES	95
RESULTATS	96
I/ CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUES	97
a) <i>Westerns blots</i>	97
i. Caractérisations précédentes.....	97
1. Expression de la Cx43	98
2. Expression de la Cx45	99
3. Expression de la Cx43 avec ARNi anti-Cx43.....	100
4. Expression de la Cx45 avec ARNi anti-Cx43.....	101
b) <i>Immunofluorescence</i>	101
i. Localisation cellulaire de Cx43 et Cx45	101
ii. Distribution de Cx43 avec ARNi anti-Cx43.....	103
1. Cellules Ni	103
2. Cellules Cx43:Cx45=1.....	104
II/ PROPRIETES ELECTRIQUES DES CANAUX DE JONCTION	105
a) <i>Paires de cellules homologues : ratio Cx43:Cx45 identique</i>	105
b) <i>Diminution d'expression de la Cx43</i>	142
i. Couplage électrique.....	142
ii. Dépendance au potentiel de jonction.....	144
1. Cellules Ni	144
2. Co-expression Cx43:Cx45=1	145
iii. Cinétiques de désactivation	147
iv. Cinétiques de restitution.....	148
1. Cellules Ni	149
Potentiel de jonction $\pm 10\text{mV}$	149
Potentiel de jonction $\pm 60\text{mV}$	149
Potentiel de jonction $\pm 120\text{mV}$	149
2. Cellules Cx43:Cx45=1.....	151
Potentiel de jonction $\pm 10\text{mV}$	151
Potentiel de jonction $\pm 60\text{mV}$	151
Potentiel de jonction $\pm 120\text{mV}$	151
v. Conductances unitaires	153
1. Cellules Ni	153
2. Cellules Cx43:Cx45=1.....	154
CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS.....	156
I/ RESUME DE MES TRAVAUX.....	157
a) <i>Caractérisation biochimique</i>	157
b) <i>Caractérisation fonctionnelle</i>	158

i.	Aucune induction d'expression de Cx45 : Ni	158
ii.	Induction d'expression de Cx45	158
iii.	Diminution d'expression de Cx43 : ARNi anti-Cx43.....	159
1.	Condition Ni.....	159
2.	Induction d'expression de Cx45 : condition Cx43:Cx45=1	159
II/	DISCUSSION	160
a)	<i>Couplage électrique</i>	<i>160</i>
1.	Induction d'expression de Cx45	160
2.	ARNi anti-Cx43.....	160
b)	<i>Dépendance au potentiel de jonction.....</i>	<i>160</i>
1.	Induction d'expression de Cx45	160
2.	ARNi anti-Cx43.....	161
c)	<i>Cinétiques de désactivation</i>	<i>161</i>
1.	Induction d'expression de Cx45	161
2.	ARNi anti-Cx43.....	162
d)	<i>Cinétiques de restitution.....</i>	<i>162</i>
1.	Induction d'expression de Cx45	162
2.	ARNi anti-Cx43.....	163
e)	<i>Conductances unitaires.....</i>	<i>163</i>
1.	Induction d'expression de Cx45	163
2.	ARNi anti-Cx43.....	163
3.	Contribution des canaux de jonctions.....	164
III/	IMPORTANCES PHYSIO-PATHOLOGIQUES DES CO-EXPRESSIONS	164
a)	<i>Importances Physiologiques</i>	<i>164</i>
b)	<i>Contributions Pathologiques</i>	<i>165</i>
IV/	PERSPECTIVES D'ETUDES	166
RÉFÉRENCES	RÉFÉRENCES	169

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein de L'Institut de RYthmologie et de modélisation Cardiaque (IHU LIRYC), Unité U1045 de l'INSERM de Bordeaux.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Thomas DESPLANTEZ pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Tu as dû me supporter durant ces trois ans et demi et tu m'as montré que je suis toujours capable de me surpasser. Merci de m'avoir appris que l'exigence est l'une des clés de la réussite. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie le Professeur Michel HAÏSSAGUERRE et le Professeur Roger MARTHAN pour m'avoir accueilli dans l'IHU LIRYC et dans l'unité U1045.

Je remercie Messieurs Patrick BOIS et Christian GIAUME d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également Mme Christelle GUIBERT et Mr Éric HOSY d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse

Je voudrais remercier Marion CONSTANTIN et sa bonne humeur. Toujours prête à aider durant ces trois ans, tu as contribué en grande partie à la réalisation de cette thèse. Je te remercie également pour ces bons moments passés en congrès à attendre devant nos posters en se demandant qui viendra nous voir.

Je remercie Virginie DUBES. Tu m'as été d'une grande aide lors de ses trois années avec tes conseils éclairés.

David BENOIST, je te remercie pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques dans ton bureau pendant que tu rédigeais tes e-mails. Tes conseils ont été très précieux ainsi que ton soutien en tout temps. Merci.

Je remercie Sabine CHARRON sans qui les westerns blots n'auraient pas été possibles. Finis les instants d'angoisse en se demandant si les protéines vont ressortir ou non.

Corentin DALLET, merci pour tous ces moments passés à t'écouter parler de ton chat, de chez toi et de toutes tes théories exubérantes.

Je remercie mes parents Sandrine et Jean-Marc DUPUIS pour leur soutien inébranlable. Vous m'avez soutenu sans faille durant toutes ces années où le doute a souvent eu sa place. Je n'aurai pas été capable de réaliser cela sans vous. Merci.

Et ma petite sœur Aline DUPUIS, que je n'ai absolument pas assez contactée et qui me l'a fait savoir. Tu es la meilleure petite sœur, gentille, douce et drôle alors je ne m'en fais pas pour toi. Merci.

A mes grands parents Jacques et Claudine DUPUIS, vous avez été à l'origine de la curiosité qui m'a poussé à continuer jusqu'à faire une thèse. Merci.

A mes amis, Laure Anne C, Antoine J, Antoine R, Jacques C, Pili FC, Kevin J, Fabrice M, Richard et Maëlle, Albano, Pedro qui m'ont apporté beaucoup de choses durant ces trois ans comme du soutien, des moments de rires, des bières... Merci à vous tous.

A Mathilde C et Aurélie E pour tous ces french du weekend et ces discussions. Vous avez ouvert les soutenances au LIRYC et maintenant je prends la suite.

Je remercie tous les membres du LIRYC pour avoir passé trois ans en leurs compagnies.

Je tiens à adresser un remerciement spécial pour toi ma Julie chérie. Tu partages ma vie depuis plus d'un an déjà et je ne vois pas ce qui pourrait nous arrêter maintenant. Merci pour ton soutien et tout ce que tu as fait pour moi. Tes encouragements m'ont permis de continuer jusqu'au bout. Merci.

Listes des publications et **communications**

Articles :

Electrical properties of gap junction channels: dependence on the ratio of co-expressed connexins Cx43 and Cx45

Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Pflüger - European Journal of Physiology (en soumission)

Electrical properties of gap junction channels: dependence on the ratio of co-expressed Connexins Cx43 and Cx40

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin, and Thomas Desplantez

Biophysical Journal (en soumission)

Communications posters :

Printemps de la cardiologie, Strasbourg (2014) :

Influence of the ratio of co-expressed cardiac connexins Cx43 and Cx45 in the formation of gap junction channels and their electrical properties

Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Co-expressed cardiac connexins: dependence on the Cx43:Cx40 ratio in regulating the gap junction channel make-up and electrical properties

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez.

Distinct contribution of cardiac connexins on regulating the action potential propagation in the healthy and diseased heart

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Frontiers in CardioVascular Biology, Barcelone (2014) :

Dependence of the cardiac connexins Cx43:Cx45 ratio on the formation of gap junction channels and their electrical properties

Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Co-expressed cardiac connexins: dependence on the Cx43:Cx40 ratio in regulating the gap junction channel make-up and electrical properties.

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Contribution of cardiac connexins on regulating the action potential propagation in the mimicked healthy and diseased heart rate

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Printemps de la cardiologie, Toulouse (2015) :

Dependence of the ratio of co-expressed connexin43 and connexin45 on the connexin composition of gap junction channels

Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Distinct ratios of co-expressed Cx40 and Cx43 regulate a fine gap junction channel make-up and properties

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Specific down-regulation of cardiac connexin and pro-arrhythmic impulse propagation under electrical pacing

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

ESC Working Group Cardio-Cellular Electrophysiology et CardioStim, Milan (2015) :

Accurate co-expression ratio of Cx43:Cx45: influence on the gap junction channels make-up and properties

Sébastien Dupuis, Marion Constantin, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Electrical properties of gap junction channels: dependence on the ratio of co-expressed Connexins Cx43 and Cx40

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Pro-arrhythmic electrical rate of atrial conduction and distinct cardiac connexins contribution in HL-1 cell line

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

International Society for Heart Research (ISHR), Bordeaux (2015) :

Dependence of the ratio of co-expressed connexin43 and connexin45 on the electrical properties and composition of gap junction channels

Sébastien Dupuis, Marion Constantin, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Electrical properties of gap junction channels: dependence on the ratio of co-expressed Connexin 43 and Connexin 40.

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Specific contribution of cardiac connexin in atrial conduction and pro-arrhythmic electrical rate in HL-1 cell line

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Printemps de la cardiologie, Dijon (2016) :

Gap junction channels make-up and properties: influence of accurate ratio of Cx43 and Cx45 co-expression

Sébastien Dupuis, Marion Constantin, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Prix poster

Effect of the Connexin43 Downregulation on the Electrical Gap Junction Channels in RLE Cells.

Sébastien Chaigne, Sébastien Dupuis, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Pro-arrhythmic electrical rate of atrial conduction and specific cardiac Cxs contribution in HL-1 cell line

Marion Constantin, Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne and Thomas Desplantez

Communication orale :

Gap junction channels make-up and properties: influence of accurate ratio of Cx43 and Cx45 co-expression

Sébastien Dupuis, Sébastien Chaigne, Marion Constantin and Thomas Desplantez

Workshop du LIRYC, Bordeaux (2016)

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie cardiaque (Société française de cardiologie)	28
Figure 2 : Système de conduction cardiaque (Sébastien Dupuis).....	30
Figure 3 : Représentation de la dépolarisation dans les myocytes pacemakers du nœud sinusal	32
Figure 4 : Potentiel d'action auriculaire et ventriculaire	33
Figure 5 : Différentes vitesses de propagation du potentiel d'action cardiaque dans les différents tissus cardiaques	35
Figure 6 : Organisation des disques intercalaires	37
Figure 7 : Structure des gènes des connexines.....	39
Figure 8 : Structure du gène de la Cx45	40
Figure 9 : Topologie membranaire des connexines	41
Figure 10 : Organisation des demi-canaux et canaux de jonction.....	42
Figure 11 : Oligomérisation des connexines	43
Figure 12 : Adressage à la membrane des demi-canaux	45
Figure 13 : Modèle des domaines extracellulaire des canaux de jonction.....	47
Figure 14 : Profils d'expression des connexines cardiaques.....	48

Figure 15 : Configurations possibles des canaux de jonction	50
Figure 16 : Sites de phosphorylation de la Cx43	51
Figure 17 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux homotypiques	56
Figure 18 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux hétérotypiques	58
Figure 19 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux hétéromériques	60
Figure 20 : Cinétiques de désactivations macroscopiques pour la Cx43	62
Figure 21 : Exemple des cinétiques de désactivations pour la Cx43	63
Figure 22 : Transitions rapide et lente	64
Figure 23 : Localisation des mécanismes de fermeture rapide et lente dans les canaux de jonctions	66
Figure 24 : Exemples de courants unitaires et fréquences de distribution des conductances unitaires des canaux homotypiques	68
Figure 25 : Courants et conductances unitaires des canaux hétérotypiques Cx43-Cx40.....	69
Figure 26 : Fréquence de distribution des conductances unitaires des canaux hétéromériques Cx43/Cx40.....	70
Figure 27 : Photos de cellules RLE en culture	75
Figure 28 : Carte du vecteur pERV3 (Agilent Technologies)	77
Figure 29 : Schéma du système ecdysone	77

Figure 30 : Régulation de la transcription par le système Ecdysone	78
Figure 31 : Formule chimique de la ponastéron A.....	79
Figure 32 : Schéma du mécanisme d’extinction d’ARN messenger (ARNm) par ARNi.....	80
Figure 33 : Principe d’électroporation	81
Figure 34 : Schéma du principe d’immunofluorescence.	83
Figure 35 : Schéma de la révélation de la Cx43 par western blot	86
Figure 36 : Le protocole expérimental.....	88
Figure 37 : Etapes de formation de la configuration cellule entière	89
Figure 38 : Exemple de protocole de dépendance au potentiel de jonction sur une paire de cellule RLE.....	90
Figure 39 : Protocole de stimulation du couplage électrique intercellulaire.	91
Figure 40 : Protocole de dépendance au V_j	92
Figure 41 : Protocole de restitution.....	93
Figure 42 : Protocole de conductances unitaires.....	94
Figure 43 : Westerns blots de Cx43 et Cx45	97
Figure 44 : Western blot d’expression de Cx43 dans les différentes conditions d’induction de Cx45	99

Figure 45 : Western blot pour la quantification de la Cx45	100
Figure 46 : Western blot pour la Cx43 dans les conditions Ni et Cx43:Cx45=1 en présence ou en absence d'ARNi anti-Cx43 aux jours 1 et 2 après transfection	100
Figure 47 : Western blot pour la Cx45 dans les cellules Ni et Cx43:Cx45=1 aux jours 1 et 2 après transfection en présence et en absence d'ARNi anti-Cx43.....	101
Figure 48 : Immunofluorescence de Cx43 et de Cx45	102
Figure 49 : Immunofluorescences de Cx43 sur des cellules non induites contrôle au jour 1 et 2 et sur des cellules non induites transfectées par ARNi anti-Cx43 au jour 1 et 2 après transfection	103
Figure 50 : Immunofluorescences de Cx43 sur des cellules Cx43:Cx45=1 au jour 1 et 2 et sur des cellules Cx43:Cx45=1 transfectées par ARNi anti-Cx43 au jour 1 et 2 après transfection	104
Figure 51 : Couplage électrique intercellulaire	143
Figure 52 : Courants de jonctions pour les conditions Ni contrôle et en présence d'ARNi anti-Cx43 et dépendance au potentiel de jonction la condition contrôle et la condition avec ARNi anti-Cx43	145
Figure 53 : Courants de jonctions pour les conditions Cx43:Cx45=1 contrôle et en présence d'ARNi anti-Cx43 et dépendance au potentiel de jonction pour la condition contrôle et avec ARNi anti-Cx43.....	146
Figure 54 : Cinétiques de désactivation pour la condition contrôle et avec l'ARNi anti-Cx43	148
Figure 55 : Rapport g_{P2}/g_{P1} en fonction du temps total après désactivation pour la condition Ni en fonction du temps total après désactivation	150
Figure 56 : Rapport g_{P2}/g_{P1} en fonction du temps total après désactivation pour la condition Cx43:Cx45=1 en fonction du temps total après désactivation	152

Figure 57 : Conductances unitaires des canaux de jonction en condition Ni contrôle et après transfection avec ARNi anti-Cx43.....153

Figure 58 : Conductances unitaires des canaux de jonction Cx43:Cx45=1 pour la condition contrôle et pour la condition avec ARNi anti-Cx43.....154

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de motifs déterminants pour l'hétéromérisation en fonction des connexines.....44

Tableau 2 : Gamme étalon de BSA utilisée pour le dosage des protéines par la méthode BCA ...84

Tableau 3 : Estimations de la quantité relative de Cx43 et de Cx45 avec et sans ponastérone A 98

Tableau 4 : Paramètres de Boltzmann.....146

Liste des abréviations

ARNi : Acide désoxyribonucléique interférent

BCA : BiCistronic Assay

BSA : Albumine sérique bovine (Bovin Seric Albumin)

Ca²⁺ : ion calcium

Cav : Canaux voltage dépendant calcique

Cl⁻ : ion chlore

CO₂ : Dioxyde de carbone

Cx30.2 : Connexine 30.2

Cx31.9 : Connexine 31.9

Cx32 : Connexine 32

Cx37 : Connexine 37

Cx40 : Connexine 40

Cx43 : Connexine 43

Cx45 : Connexine 45

D.O. : Densité optique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

Eion : Potentiel d'équilibre de l'ion

Em : Potentiel de membrane

EPC : Electroporation contrôle

Erp29 : Endoplasmic reticulum protein 29

FITC : fluorescein isothiocyanate

G_{j,0} : couplage électrique de jonction

g_{j,inst} : conductance de jonction à l'état instantané

g_{j,ss} : conductance de jonction à l'état stable

HCN : canaux dépendants des nucléotides cycliques activés par hyperpolarisation membranaire

HRP : Horseradish peroxidase

I_{Ca} : Courant calcique

I_j : Courant de jonction

I_K : Courant potassique

IP₃ : Inositol triphosphate

IRES : Internal entry ribosomic site

I_{to} : Courant potassique transitoire sortant

K⁺ : ion potassium

Kv : Canaux voltage dépend potassique

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

Na⁺ : ion sodium

Nav : Canal voltage dépendant sodique

PBS : Phosphate buffer saline

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

RLE : Cellules épithéliales de foie de rat (Rat liver Epithelial cells)

Rpm : Rotation par minute

Rs : Résistance en série

RxR : retinoid-X-receptor

SBF : Sérum bovin fétal

SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TBS : Tris buffered saline

τ_{d,1} : Constante de temps rapide

τ_{d,2} : Constante de temps lente

VgEcR : Récepteur à l'ecdysone modifié

V_j : Potentiel de jonction

ZO-1 : Zona-occludens 1

γ_m : Conductance unitaire de jonction principale

γ_r : Conductance unitaire de jonction résiduelle

Résumé

Influence de ratios de co-expression précis Cx43:Cx45 sur la formation des canaux de jonction et leurs propriétés électriques

Les canaux de jonctions (CJ) composés des connexines (Cxs) assurent la communication intercellulaire directe qui par leur propriétés électriques régulent la propagation du potentiel d'action (PA) cardiaque. Dans les myocytes ventriculaires Cx43 et Cx45 exprimées à des niveaux et ratios physiopathologiques variables assurent cette fonction. Cette étude détermine la contribution de Cx43 et Cx45 dans la formation des CJ et leurs propriétés électriques.

La lignée cellulaire épithéliale de foie de rat exprimant la Cx43 endogène et transfectée de manière stable pour exprimer des ratios Cx43:Cx45 précis a été utilisée. Les propriétés électriques des CJ ont été obtenues par double voltage clamp sur paires de cellules. L'expression de la Cx45 diminue le couplage électrique et augmente la dépendance au potentiel de jonction indépendamment du ratio. Les cinétiques de désactivation sont ralenties avec l'augmentation du niveau d'expression de Cx45 et les cinétiques de restitution sont modifiées en fonction du ratio. Les conductances unitaires suggèrent la formation de CJ composés de Cx43 et Cx45. La diminution du niveau d'expression de Cx43 par ARNi anti-Cx43 entraîne une diminution du couplage électrique tandis que les autres propriétés électriques restent inchangées.

Ces résultats montrent une contribution spécifique de Cx43 et Cx45 dans la régulation de la formation et des propriétés électriques des CJ caractérisées. Ces propriétés seront corrélées à la participation des CJ dans la régulation de la propagation du PA en fonction des profils d'expression des Cxs en conditions physiologiques et pathologiques.

Mots clés : Jonctions communicantes, connexines, double voltage clamp, propriétés électriques.

Influence of Cx43:Cx45 accurate co-expressed ratios on gap junction channels formation and their electricals properties

Gap junction channels (GJCs), composed of connexins (Cxs) allow a direct intercellular communication that ensures the cardiac action potential (AP) propagation. Cx43 and Cx45 co-expressed in ventricular myocytes with changing expression levels and ratios in the healthy and the diseased heart ensure this function. The purpose of this study is to determine the contribution of Cx43 and Cx45 on the formation of GJCs and their electrical properties.

Rat Liver Epithelial cells that endogenously express Cx43 and stably transfected to co-express accurate Cx43:Cx45 ratios have been used. The electrical properties of GJCs at each ratios were obtained by performing dual voltage clamp recordings on cell pairs. Expression of Cx45 decreases the electrical coupling and increases the voltage dependence independently of the ratio. The kinetics of deactivation are slowed with the increases of Cx45 level of expression and the kinetics of recovery are modified in a Cx43:Cx45 ratio dependent manner. Unitary conductances suggest a formation of GJCs composed by Cx43 and Cx45. The decreases of Cx43 level of by a SiRNA treatment induces a decrease of the electrical coupling, while other electrical properties are not affected.

Our data show a specific contribution of Cx43 and Cx45 in regulation of the GJCs characterized by specific electrical properties. Such properties will be correlated to the function of GJCs in regulating the AP propagation in the specific patterns of expression of Cxs in the healthy and diseased heart.

Keywords: Gap junctions, connexins, dual voltage clamp, electrical properties

Introduction

Le cœur est un muscle strié responsable de la circulation sanguine de l'ensemble de l'organisme par ses contractions rythmiques. Un contrôle du rythme de contraction est essentiel afin d'assurer son fonctionnement, qui est rendu possible par la propagation d'un potentiel d'action à l'ensemble des myocytes du cœur. Des différences physiologiques de la propagation du potentiel d'action sont observées entre les différents tissus cardiaques (par exemple entre les ventricules et les oreillettes). Des perturbations pathologiques de cette propagation causent une dérégulation de la contraction cardiaque comme dans les fibrillations auriculaires et ventriculaires pouvant avoir un caractère létal dans les cas les plus sévères.

La propagation du potentiel d'action est assurée par des facteurs actifs et passifs, ces derniers étant représentés principalement par les jonctions communicantes et est fonction des propriétés électriques des canaux de jonctions les composants. Leur composition en connexines est déterminante dans l'établissement des propriétés électriques de ces canaux et leur étude est essentielle pour la compréhension de la régulation du potentiel d'action en conditions physiologiques et pathologiques.

I/ Anatomie et conduction cardiaque

a) Anatomie cardiaque et circulation

Le cœur est un organe composé de quatre chambres : deux oreillettes (gauche et droite) et deux ventricules (gauche et droit) séparées par une cloison appelée septum.

Les veines caves supérieures et inférieures apportent le sang dans l'oreillette droite. L'oreillette droite est séparée du ventricule droit par la valve tricuspide, de même, la valve pulmonaire sépare le ventricule droit de l'artère pulmonaire. Dans l'oreillette gauche le sang est acheminé via 4 veines pulmonaires (2 gauches et 2 droites), et la valve mitrale sépare l'oreillette gauche du ventricule gauche, lui-même séparé de l'aorte par la valve aortique (Figure 1).

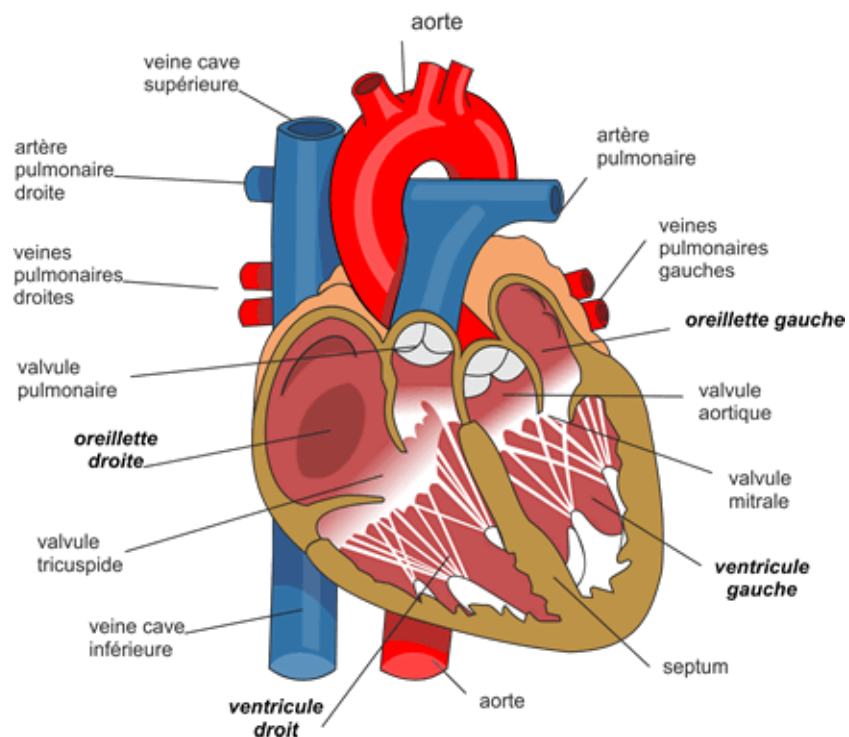


Figure 1 : Anatomie cardiaque (Société française de cardiologie).

La circulation systémique apporte le sang oxygéné aux organes via l'aorte et assure le retour du sang appauvri en oxygène dans le cœur par les veines caves supérieure et inférieure dans l'oreillette droite. La contraction du ventricule droit expulse le sang dans la circulation pulmonaire

via les artères pulmonaires. La circulation pulmonaire ré-oxygène le sang, élimine le dioxyde de carbone et revient dans le cœur par les veines pulmonaires puis l'oreillette gauche et passe dans le ventricule gauche afin d'être expédié dans la circulation systémique.

Pour que la circulation soit assurée il est nécessaire d'avoir une contraction synchronisée des oreillettes dans un premier temps afin d'envoyer le sang dans les ventricules, puis des ventricules pour expulser le sang dans les circulations pulmonaire et systémique. Les contractions sont stimulées par un potentiel d'action qui se propage dans tout le cœur via un système de conduction et au niveau des myocytes par les jonctions communicantes (cf : potentiel d'action et jonctions communicantes).

b) Système de conduction cardiaque

La propagation du potentiel d'action entre tous les myocytes cardiaques est assurée par les jonctions communicantes. De plus, des tissus spécialisés permettent de contrôler la propagation du potentiel d'action, c'est le système de conduction cardiaque. Le potentiel d'action est initié au niveau du nœud sinusal situé dans l'oreillette droite. La propagation dans les oreillettes se fait par les fibres internodales et de Bachmann (Berenfeld and Zaitsev, 2004) pour arriver dans le nœud atrio-ventriculaire et à l'ensemble des myocytes via les jonctions communicantes. La propagation se poursuit via le faisceau de His puis les fibres de Purkinje et atteint les myocytes ventriculaires (Figure 2).

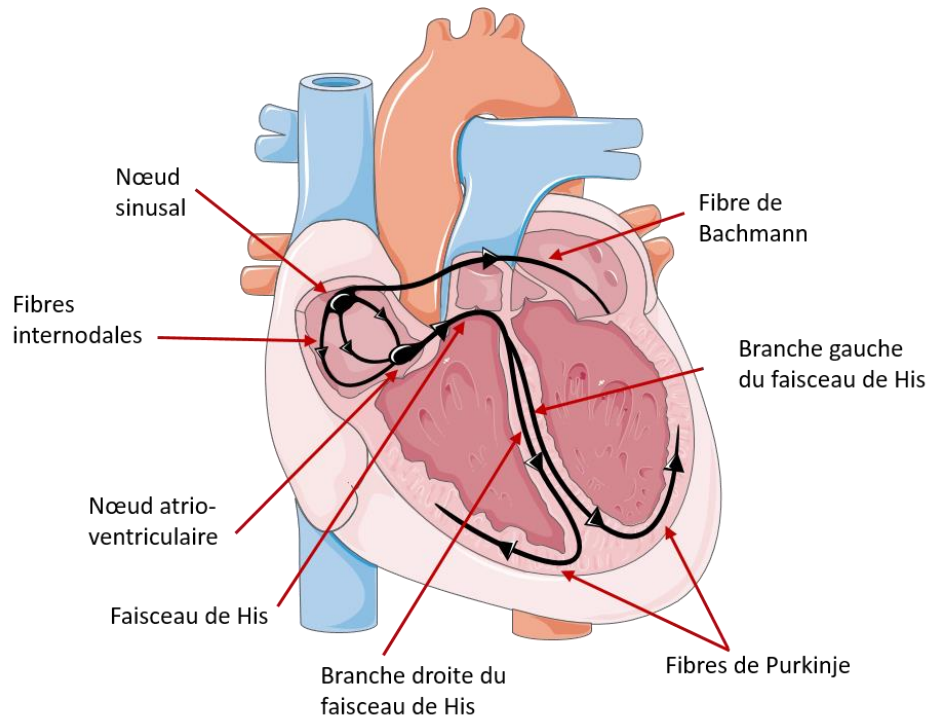


Figure 2 : Système de conduction cardiaque (Sébastien Dupuis).

c) Le potentiel d'action cellulaire

i. Définition

Le potentiel d'action est généré par un passage d'ions via des canaux ioniques membranaires voltages dépendants (par exemple : les canaux Nav1.5) et dépend du gradient électrochimique ionique. Ce gradient électrochimique détermine le potentiel d'équilibre des ions qui représente un potentiel de membrane et des concentrations intra et extracellulaire pour lequel autant d'ions rentrent et sortent de la cellule. Ceci est calculé par l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} * \ln \left(\frac{C_e}{C_i} \right)$$

E_{ion} correspond au potentiel d'équilibre de l'ion, R est la constante des gaz parfaits, T est la température en Kelvin, F est la constante de Faraday, C_e et C_i sont les concentrations extra- et intracellulaires respectivement de l'ion. Le gradient électrochimique des ions et l'activation ou

l'inactivation des canaux ioniques permettent de déterminer le potentiel de membrane (E_m) des cellules.

Au repos, le potentiel de membrane E_m peut être estimé par l'équation de Hodgkin-Goldman-Katz :

$$E_m = \frac{RT}{F} * \ln \frac{PK[K^+]_e + PNa[Na^+]_e + PCl[Cl^-]_i}{PK[K^+]_i + PNa[Na^+]_i + PCl[Cl^-]_e}$$

où P_x est le coefficient de perméabilité des différents ions.

Les myocytes ventriculaires ont un potentiel de membrane d'environ -90mV tandis que les myocytes du nœud sinusal ont un potentiel de membrane d'environ -60mV.

ii. Initiation du potentiel d'action cardiaque

Les myocytes du nœud sinusal possèdent une activité autonome rythmique qui se traduit par une dépolarisation progressive du potentiel de membrane suite à l'activation de canaux voltage dépendant responsables du courant I_f (les canaux HCN, (Altomare et al., 2003; DeBerg et al., 2016; Whitaker et al., 2007)). Ces canaux s'activent pour des potentiels de membranes compris entre -65mV et -50mV (Baruscotti et al., 2005) et dépolarisent la membrane pour atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type L voltages dépendants responsables de la dépolarisation de la membrane plasmique (Figure 3).

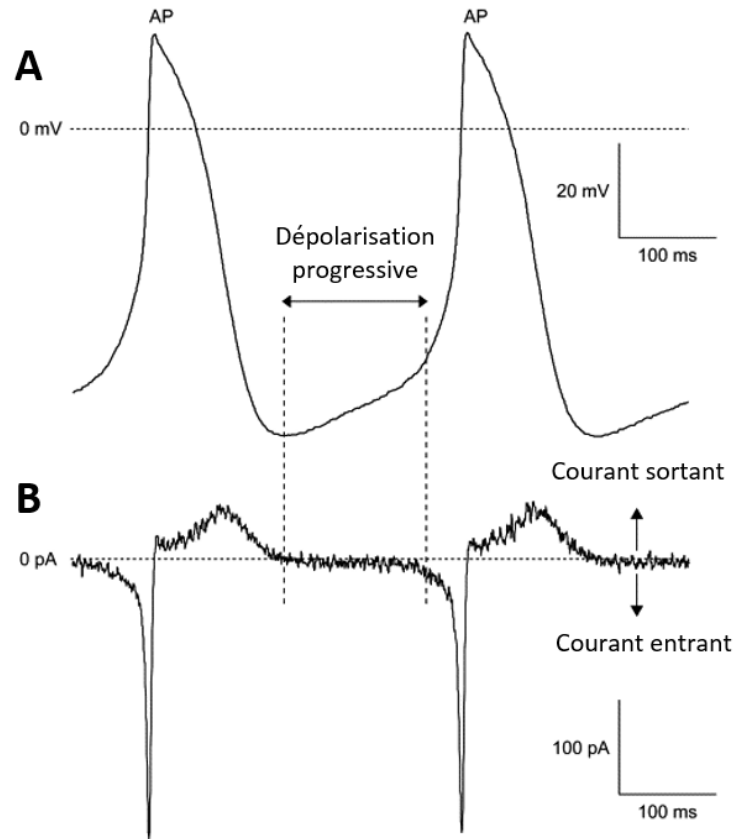


Figure 3 : Représentation de la dépolarisation dans les myocytes pacemakers du nœud sinusal. L'enregistrement des potentiels de membrane (A) montre une dépolarisation spontanée de la membrane entre deux potentiels d'action causée par le courant entrant I_f (B) (Adaptée de Vervek A et al., 2009).

iii. Potentiel d'action auriculaire et ventriculaire

De par les profils d'expression des canaux ioniques membranaires, les potentiels d'actions initiés dans les myocytes auriculaires et ventriculaires ont des formes spécifiques, différentes du potentiel d'action sinusal. Le potentiel d'action se compose de différentes phases qui correspondent à l'activation et à l'inactivation séquentielles des canaux ioniques conduisant à une dépolarisation de la membrane plasmique avec des courants entrants (Na^+ et Ca^{2+}) et une repolarisation de la membrane plasmique avec des courants sortants (K^+) principalement.

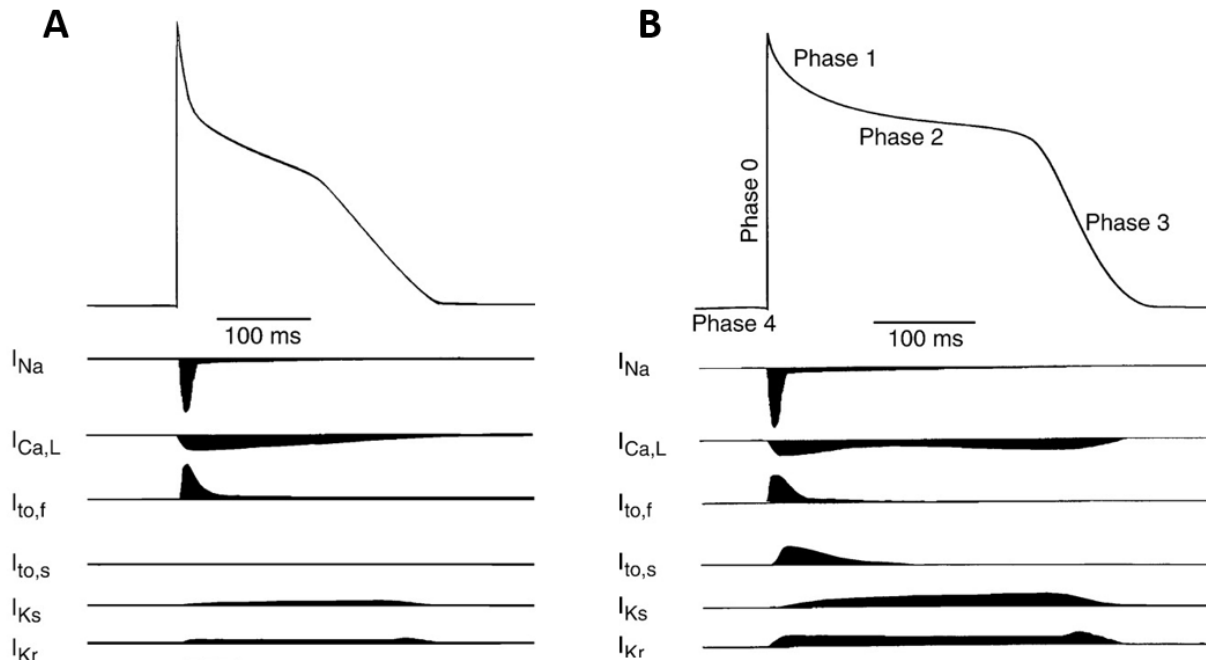


Figure 4 : Potentiel d'action auriculaire (A) et ventriculaire (B) chez l'homme adulte et principaux courants ioniques médié par les canaux ioniques voltages dépendants dont les activations et inactivations décomposent le potentiel d'action en quatre phases (Adaptée de Nerbonne JM et al 2005).

La phase 0 (Figure 4) correspond à la dépolarisation rapide de la membrane par une entrée de Na^+ suite à l'activation des canaux sodiques dépendant du potentiel de membrane. Ces canaux s'inactivent rapidement et sont désinactivés et réactivables lors d'un retour au potentiel de repos (Catterall, 2000; Zimmer et al., 2014).

La phase 1 (Figure 4) est une repolarisation causée par l'inactivation des canaux Nav1.5 et l'activation du courant I_{to} (courant sortant K^+).

La phase 2 (Figure 4) est un plateau dû à un équilibre des courants ioniques entre les courants repolarisants sortants I_K et les courants dépolarisants I_{Ca} entrants (Bers and Perez-Reyes, 1999). Le délai d'inactivation des canaux Cav détermine la durée du plateau. Les myocytes auriculaires ont une phase 2 moins prononcée due à une densité de canaux Cav moins importante que dans les myocytes ventriculaires (Grandi et al., 2011).

La phase 3 (Figure 4) est une repolarisation. Les canaux responsables du courant I_{Ca} s'inactivent et les canaux responsables des courants I_{Kr} et I_{Ks} assurent la repolarisation et un retour au potentiel de repos des myocytes.

La phase 4 (Figure 4) est la phase où le potentiel de membrane est au repos.

d) Vitesses de propagations

Les vitesses de propagation du potentiel d'action sont régulées par des facteurs actifs (canaux ioniques voltages dépendants) et des facteurs passifs (tailles et formes des myocytes, jonctions communicantes). Ces vitesses varient en fonction du tissu. Par exemple, la vitesse est plus faible dans le nœud sinusal et atrio-ventriculaire que dans le faisceau de His et les fibres de Purkinje (Figure 5). La densité des canaux ioniques ainsi que l'organisation et la composition en connexines des jonctions communicantes des myocytes sont considérées comme facteurs majeurs qui régulent cette vitesse.

Plus précisément, une vitesse de propagation d'environ 0,05m/s est retrouvée dans le nœud sinusal. Puis la vitesse de propagation dans les oreillettes atteint environ 0,5 à 1m/s. La vitesse est ralentie dans le nœud atrio-ventriculaire (Anderson et al., 2013), atteignant une vitesse similaire au nœud sinusal. Dans le système de conduction (Faisceau de His, branches du faisceau de His et fibres de Purkinje), la vitesse de propagation atteint 2m/s. Le potentiel d'action se propage dans les ventricules à une vitesse d'environ 0,5m/s (Figure 5).

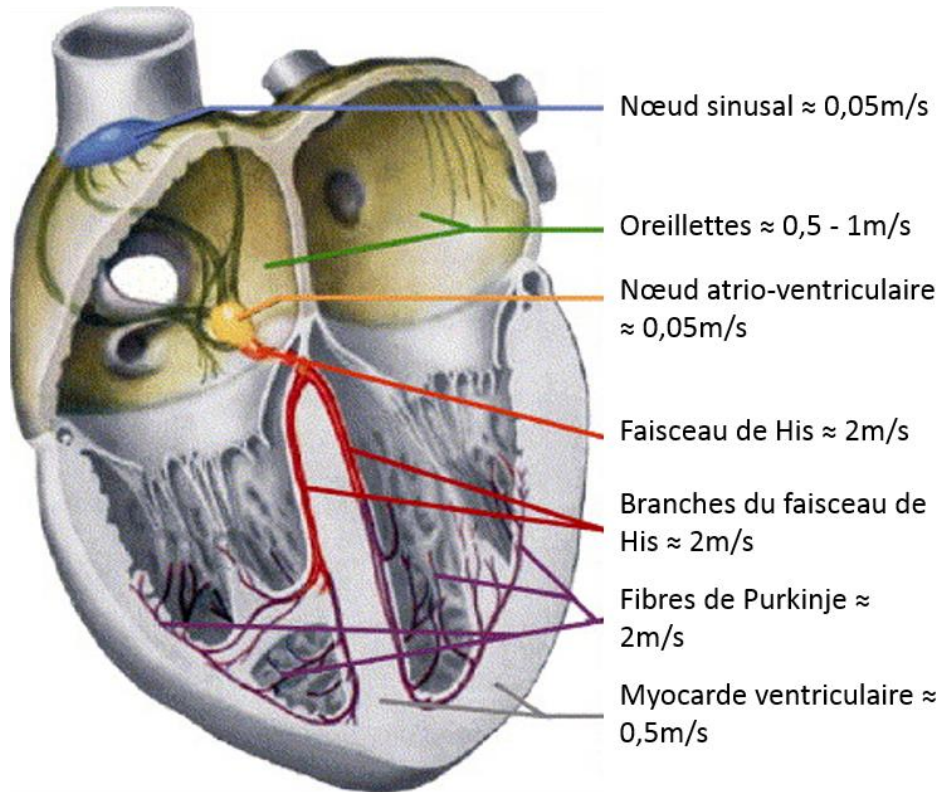


Figure 5 : Différentes vitesses de propagation du potentiel d'action cardiaque dans les différents tissus cardiaques (Adaptée de Netter, 1993).

Les jonctions communicantes ont un rôle clé dans la propagation du potentiel d'action entre les myocytes et sont contenues principalement dans une structure spécialisée appelée disque intercalaire.

e) Disques intercalaires

Les disques intercalaires (Figure 6) sont composés des desmosomes, des *fasciae adherens* et des jonctions communicantes (Figure 6, (Gourdie et al., 1991)).

i. Desmosomes

Les desmosomes assurent l'adhésion intercellulaire (Gutstein et al., 2003) et contribuent à la propagation de la force mécanique de la contraction. Ils sont reliés au cytosquelette par des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules.

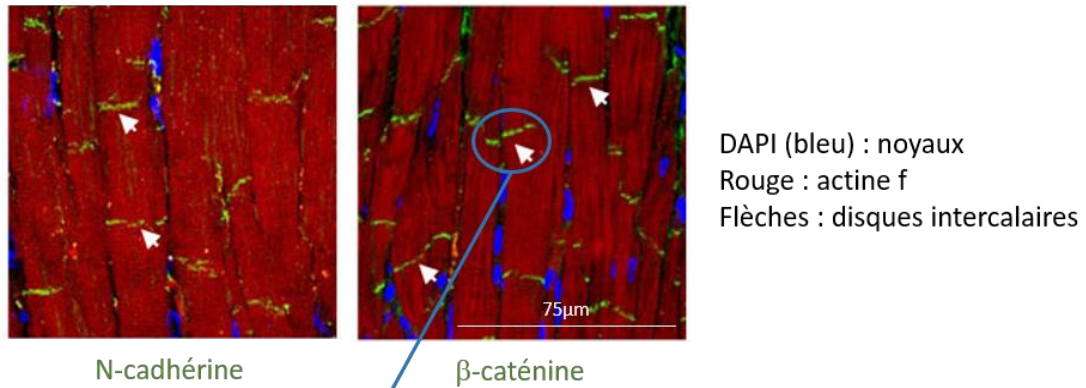
ii. *Fasciae adherens*

Les *fasciae adherens* transmettent la force entre les cellules et permettent l'ancrage des myofibrilles aux disques intercalaires (Gutstein et al., 2003).

iii. Jonctions communicantes

Les jonctions communicantes assurent une continuité cytoplasmique entre les myocytes permettant la propagation électrique du potentiel d'action et des échanges biochimiques entre les cellules adjacentes par le passage de métabolites (par exemple : AMPc (Bedner et al., 2006), IP3, (Niessen et al., 2000), etc.) d'un poids moléculaire inférieur à 1,2kDa.

A



B

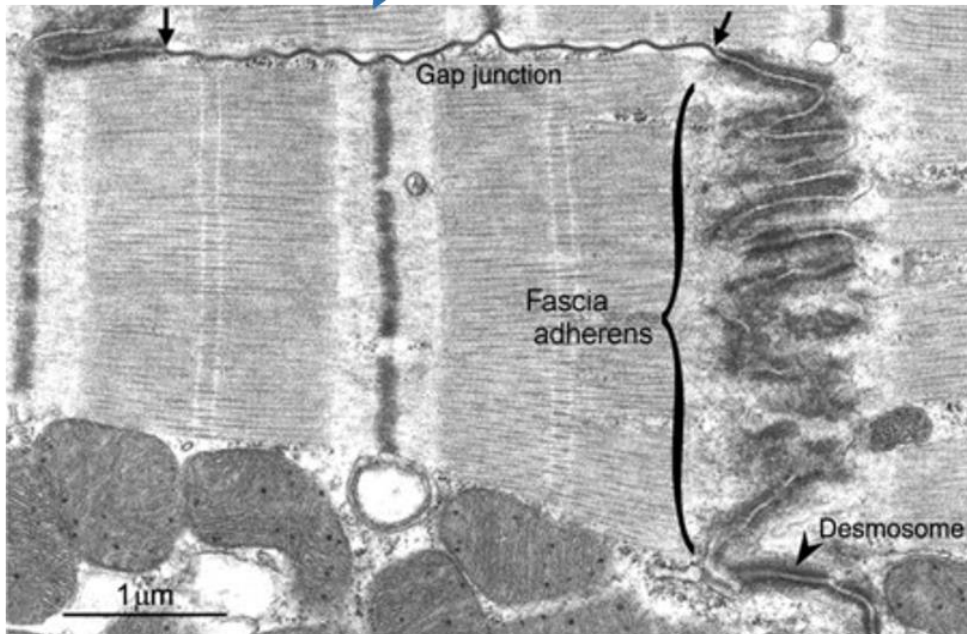


Figure 6 : Organisation des disques intercalaires. A : distribution des disques intercalaires au niveau longitudinal des myocytes (Adaptée de Katanosaka Y et al., 2014). B : microscopie électronique de disque intercalaire (Adaptée de Severs NJ et al., 2008).

iv. Interactions moléculaires : le connexome

Le connexome représente les notions de dynamismes et d'interactions moléculaires entre les protéines des disques intercalaires (connexines, canaux ioniques, protéines de structures, etc.). Par exemple entre la connexine 43 (Cx43) et la zona occludens-1 (Hunter et al., 2005; Rhett et al.,

2011), et la Cx43 et les canaux Nav1.5 (T. Desplantez et al., 2012; Jansen et al., 2012) des interactions sont observées. Des modifications physiologiques peuvent réguler le couplage intercellulaire (Agullo-Pascual et al., 2013) mais aussi présenter un potentiel pro-arythmique. Ceci s'illustre par exemple par la diminution de la densité membranaire de canaux Nav1.5 et de l'amplitude du courant I_{Na} suite à une diminution du niveau d'expression de la Cx43 (T. Desplantez et al., 2012; Jansen et al., 2012).

II/ Jonctions communicantes, canaux de jonction et connexines

a) Nomenclature

Vingt isoformes de connexines sont caractérisées chez la souris et 21 chez l'homme (Söhl and Willecke, 2004). La nomenclature la plus utilisée définit les connexines en fonction de leurs poids moléculaires en kiloDalton (kDa). Ainsi la connexine 43 (Cx43) a un poids moléculaire de 43 kDa (Beyer et al., 1987). Une seconde nomenclature classe les gènes des connexines en groupes (α , β , γ ...) en fonction du degré d'homologie de séquence (Bennett et al., 1994; Söhl et al., 2003, 1998). De plus, les gènes sont numérotés en fonction de l'ordre de leur découverte ; par exemple le gène de la Cx43, premier du groupe α , est nommé GJA1 (Söhl and Willecke, 2004).

b) Gènes des connexines

La plupart des gènes des connexines possèdent une structure similaire : un exon correspondant à la partie 5' non traduite (UnTranslated Region ; UTR) suivis par un intron de taille variable entre les connexines, puis terminé par un second exon contenant la totalité de la séquence codante et la partie 3'UTR (Figure 7).

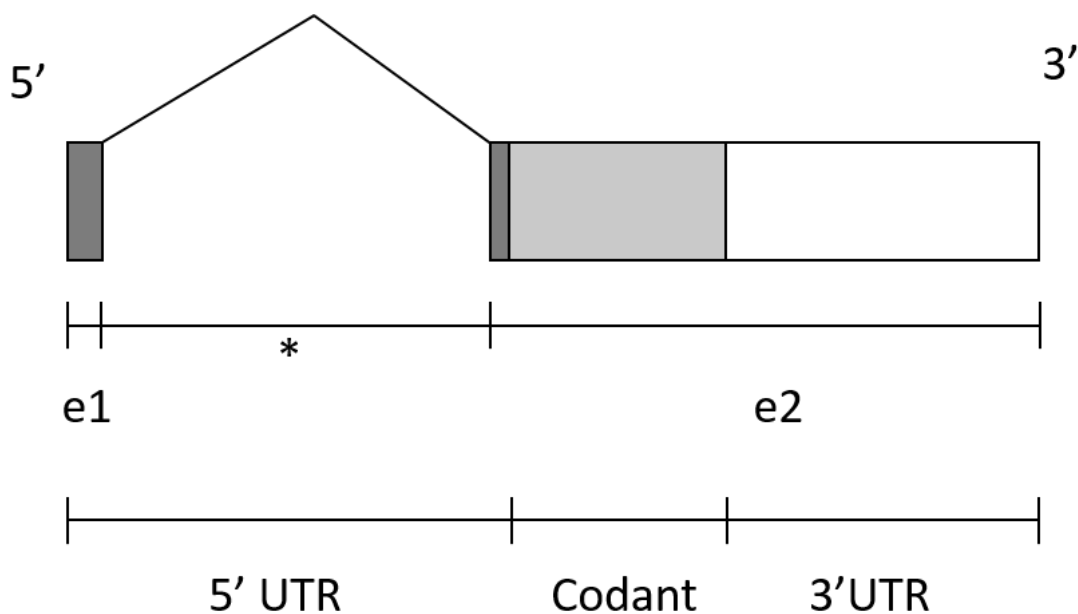


Figure 7 : Structure des gènes des connexines chez la souris (e1, e2 : exons ; * : intron). (Adaptée de Söhl G and Willecke K, 2004).

Le gène codant pour la Cx45 possède cinq exons permettant un épissage alternatif (Anderson et al., 2005). La séquence codante de la Cx45 est contenue dans son intégralité sur le troisième exon ((Krüger et al., 2000), Figure 8). Différents ARN messager (ARNm) sont générés par cet épissage alternatif et contiennent : e1a/e2/e3 ; e1b/e2/e3 ; e1c/e2/e3 ; e2/e3 (Figure 8). L'épissage alternatif est nécessaire pour un contrôle de la transcription de l'ARNm de la Cx45 (Anderson et al., 2005; Werner, 2000). La transcription de l'ARN de la Cx45 en fonction de l'épissage alternatif est spécifique aux tissus : l'expression de l'ARNm contenant e1a est exprimé dans la majorité des tissus et n'a pas été retrouvé dans le thymus, l'ARNm contenant e1b est retrouvé à l'état de trace dans le colon et l'ARNm contenant e1c est retrouvé dans le colon, la vessie, les poumons, les muscles squelettiques, les ovaires et le cœur (Oyamada et al., 2013). A ma connaissance, aucune caractérisation fonctionnelle en fonction des différents épissages alternatifs n'a été réalisée.

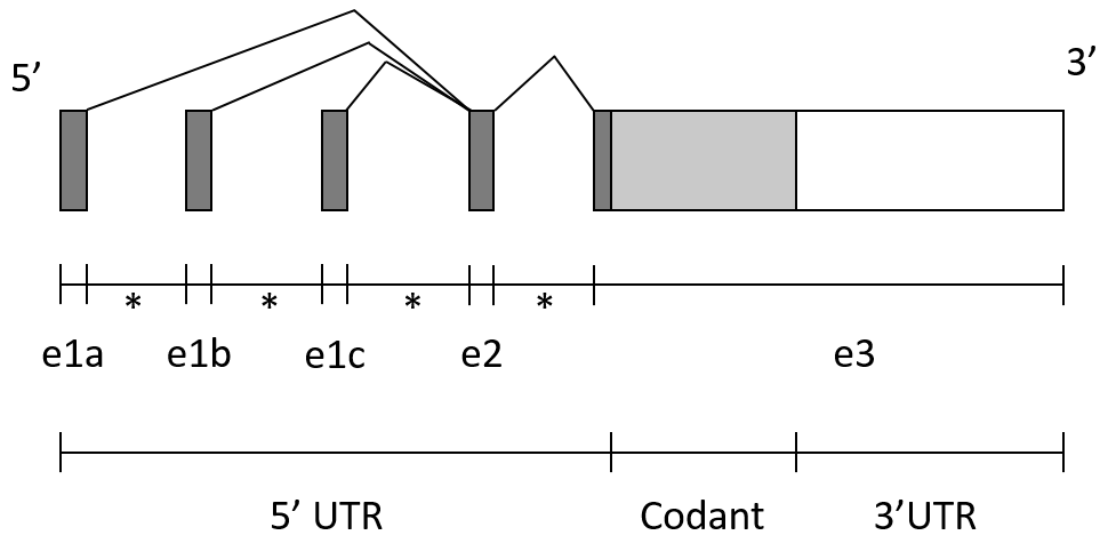


Figure 8 : Structure du gène de la Cx45 (e1a, e1b, e1c, e2, e3 : exons ; * : introns). (Adaptée de Anderson CL et al., 2005).

c) Topologie membranaire

Les connexines sont composées de quatre segments transmembranaires (TM1-4), d'un domaine N-terminal intracellulaire (NT), une boucle intracellulaire (IL), un domaine C-terminale intracellulaire (CT), et deux boucles extracellulaires (EL-1 et EL-2, Figure 9).

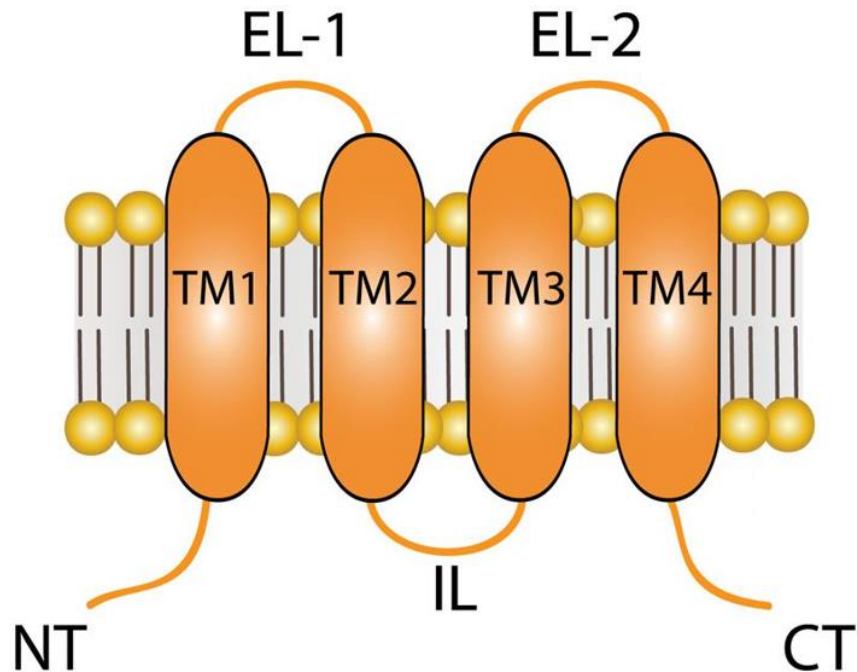


Figure 9 : Topologie membranaire des connexines. NT : domaine N-terminal, TM 1 à 4 : segments transmembranaires, EL 1 et 2 : boucles extracellulaires, IL : boucle intracellulaire, CT : domaine C-terminal (adaptée de Retamal MA et al., 2015).

d) Oligomérisation des connexines

Les canaux de jonction sont composés de deux demi-canaux insérés dans la membrane des cellules adjacentes ; chaque demi-canal est composé de 6 connexines ((Harris, 2001), figure 10).

Le lieu d'oligomérisation des connexines est déterminé en fonction de l'affinité des différentes isoformes de connexines pour les protéines chaperonne du réticulum endoplasmique (dont « Endoplasmic reticulum protein 29 » ou Erp29). Cette affinité est déterminée par la présence d'un motif de séquence au niveau de la boucle cytoplasmique et du domaine transmembranaire 3. Trois groupes de connexines ont été caractérisés en fonction de la présence de motifs spécifiques : le type « R » contenant les acides aminés lysine ou arginine, le type « W » ayant un motif double tryptophane et le type « Autres » (Tableau 1).

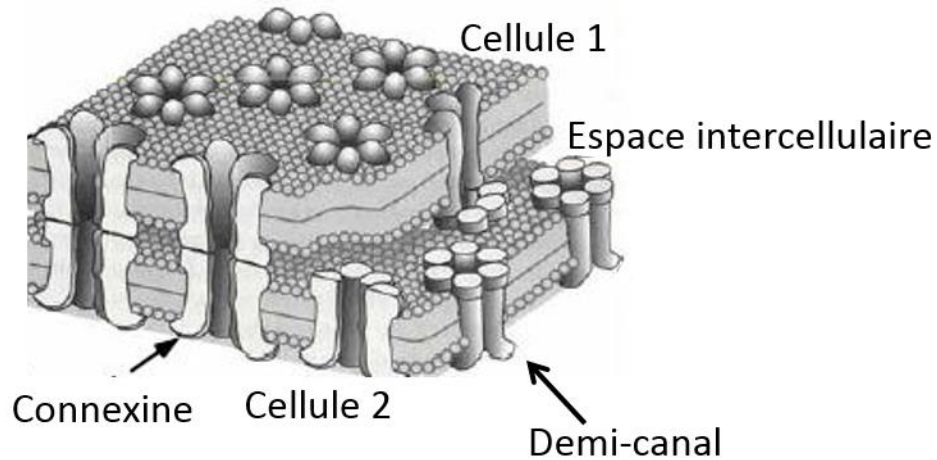


Figure 10 : Organisation des demi-canaux et canaux de jonction à la membrane de cellules adjacentes (Adaptée de Loewenstein WR et al. 1967).

La protéine Erp29 se fixe sur les connexines de type « R » et sur certaines de type « Autres » (comme la Cx40 par exemple) dans le réticulum endoplasmique, ce qui empêche l'oligomérisation de ces connexines jusque dans le trans-golgi. Ces connexines sont transportées dans l'appareil de Golgi où elles sont dissociées d'Erp29. Au niveau du trans-Golgi, ces connexines peuvent être oligomérisées avec des connexines de la même isoforme, pour former des homomères ou d'isoformes différentes pour former des hétéromères (Figure 11).

Les connexines du type « W » et du type « Autre » (par exemple la Cx37) ne possèdent pas cette affinité pour la Erp29. Ces connexines peuvent s'oligomériser dès le réticulum endoplasmique avec des connexines de même isoforme ou d'isoformes différentes (Figure 11).

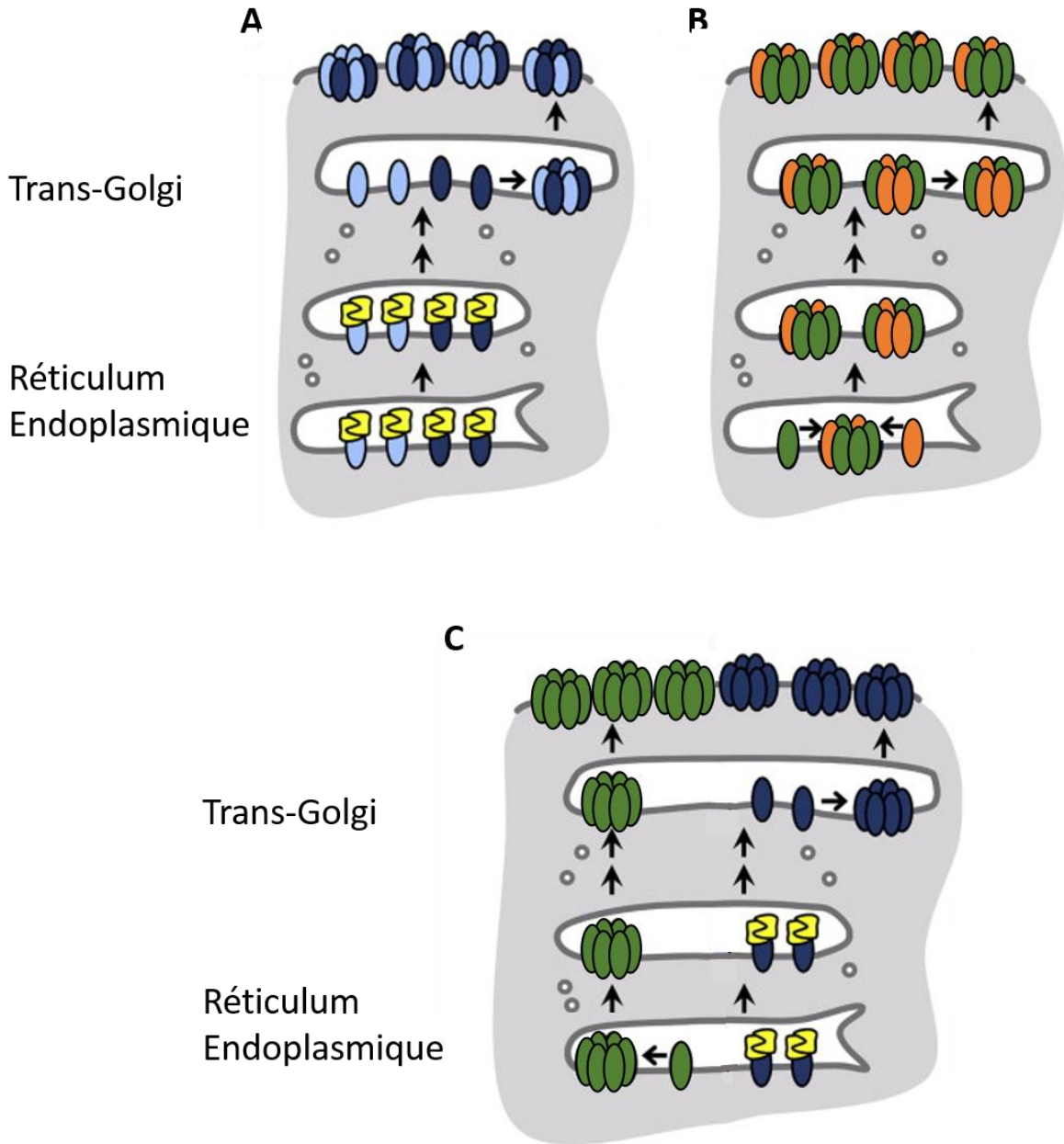


Figure 11 : Oligomérisation des connexines dans le cas de demi-canaux de jonction composés de connexines du type « R » (A), du type « W » (B) et incompatibilité lors de la co-expression de connexines de type « R » et « W ». Les connexines oligomérisées au niveau du trans-golgi (bleues claires et foncées) interagissent avec la Erp29 (jaune) tandis que les connexines oligomérisées au niveau du réticulum endoplasmique (vert et orange) n'interagissent pas avec Erp29. (Adaptée de Koval M et al., 2014).

Connexine	Groupe	Motif	Séquence
Type R			
Cx43	α	LLRTY	151-155
Cx45	γ	LMKIY	173-177
Cx31.9	δ	ARRCY	132-136
Type W			
Cx32	β	LWWTY	131-135
Autres			
Cx37	α	LMGTY	151-155
Cx40	α	LLNTY	149-153

Tableau 1 : Exemples de motifs déterminants pour l'hétéromérisation en fonction des connexines (Adaptée de Koval M et al 2014).

De façon intéressante (notamment par rapport à mon projet de thèse), les études ont montré que les connexines du groupe « R » forment des demi-canaux avec d'autres isoformes du groupe « R » ou certaines du type « Autres » tandis que les connexines du groupe « W » s'hétéromérisent avec d'autres isoformes du groupe « W » et certaines de type « Autres » (Figure 11). Les études ont montré que Cx43 et Cx45 de type « R » (Tableau 1) sont homo- et hétéro-oligomérisées au niveau du trans-golgi (Beyer et al., 2001; Smith et al., 2012) (Tableau 1), de même que Cx40, étant de type « Autres » qui s'oligomérisent au niveau du trans-golgi et forme des demi-canaux homomériques et hétéromériques avec Cx43 et Cx45 (Beyer et al., 2001; Smith et al., 2012).

e) Adressage à la membrane

Les demi-canaux sont transportés jusqu'à la membrane plasmique en suivant les microtubules ((Shaw et al., 2007), Figure 12) et se localisent principalement au niveau d'une région membranaire entourant la jonction communicante appelée périnexus (Rhett et al., 2011). Cette région contient des protéines de structures telles que la zona-occludens 1 (ZO-1 ; (Hunter and Gourdie, 2008) et des canaux ioniques tels que les canaux Nav1.5 (Rhett et al., 2012). A partir de là, les demi-canaux diffusent vers le centre des jonctions communicantes et forment des canaux de jonction en s'associant avec les demi-canaux de la cellule adjacente (Rhett and Gourdie, 2012).

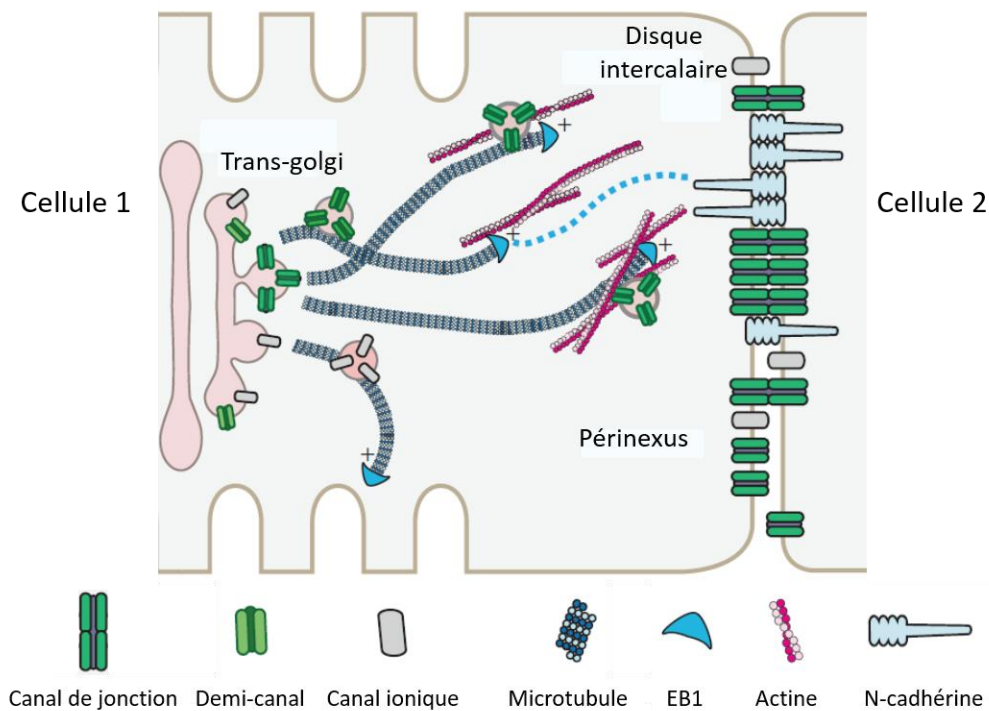


Figure 12 : Adressage à la membrane des demi-canaux via les microtubules (Adaptée de Zhang SS and Shaw RM, 2014).

f) Formation des canaux de jonctions

L'assemblage de demi-canaux se fait via les boucles extracellulaires qui possèdent trois résidus cystéine conservés entre les différentes connexines (Beyer et al., 1987). Ces cystéines forment des ponts covalents disulfure entre les boucles extracellulaires 1 et 2 d'une même connexine et adoptent une structure en double feuillet β (Figure 13, (Foote et al., 1998). De plus l'établissement de liaisons hydrogènes entre les demi-canaux adjacents est nécessaire pour former le canal de jonction (Nakagawa et al., 2011) et isoler le pore du canal de jonction du milieu extracellulaire (Figure 13).

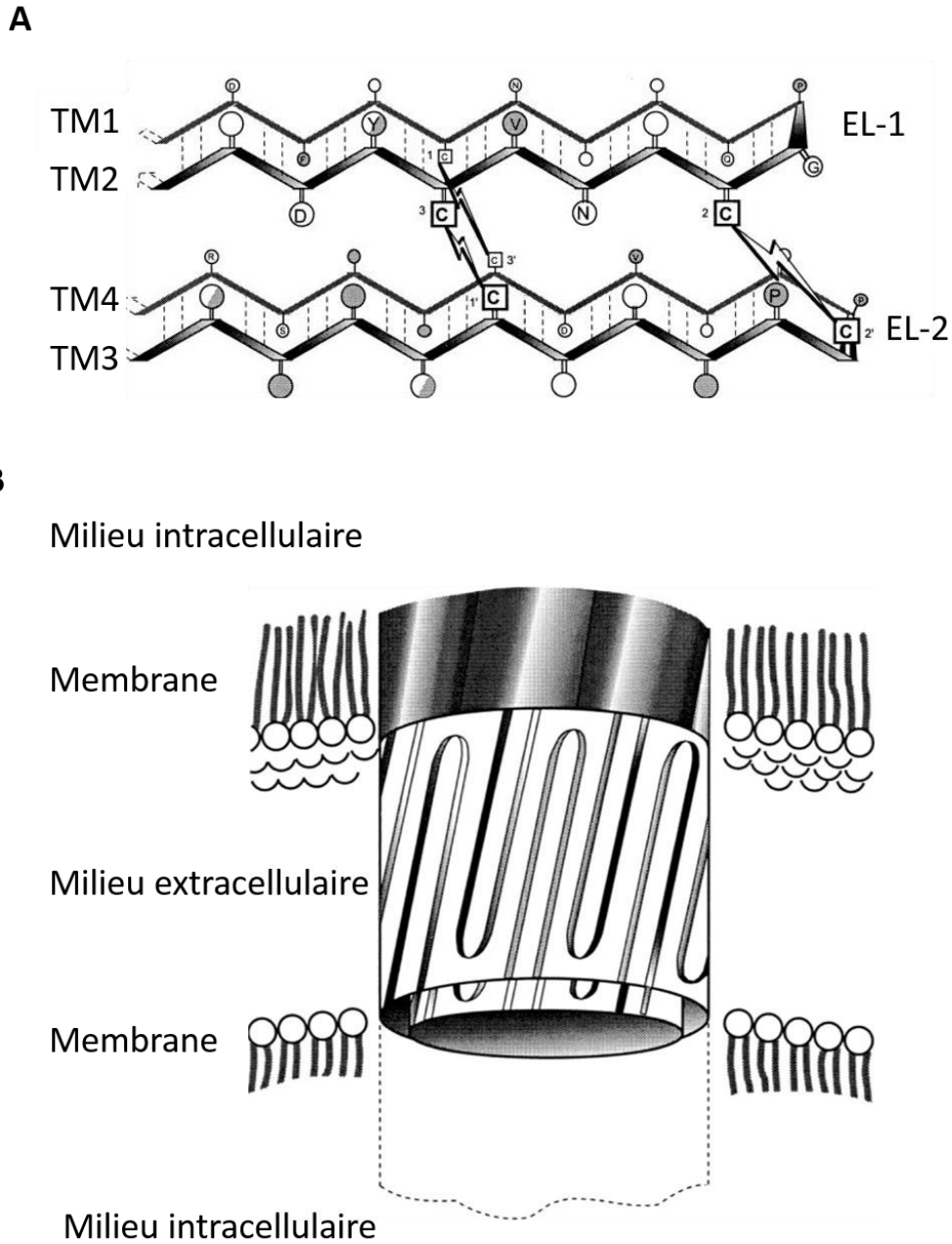


Figure 13 : Modèle des domaines extracellulaire des canaux de jonction. **A** : Formation des feuillets β antiparallèles des domaines EL-1 et EL-2 reliés par les ponts disulfure. **B** : Interdigitation des boucles extracellulaires et formation du pore du canal de jonction. (Adaptée de Foote et al 1998).

g) Profils d'expressions cardiaques

Dans le cœur 4 isoformes sont caractérisées, les Cx40, Cx43, Cx45 et Cx30.2 (Kreuzberg et al., 2006; Vozzi et al., 1999) et possèdent des profils d'expression spécifiques (Figure 14).

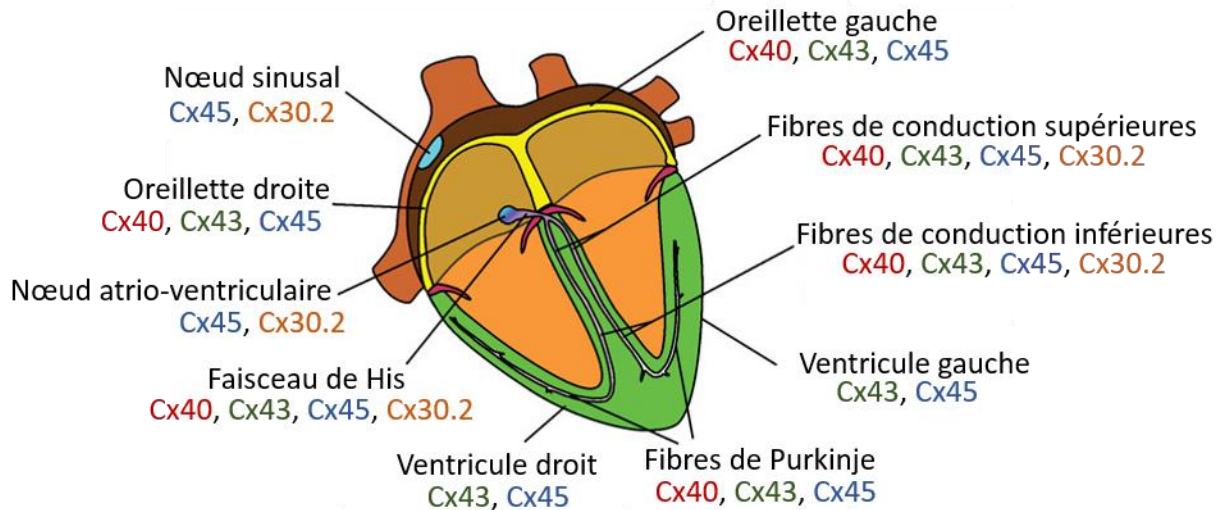


Figure 14 : Profils d'expression des connexines cardiaques dans le cœur de souris adulte (Adaptée de Severs NJ, 2008).

La Cx45 est la première connexine exprimée durant le développement embryonnaire cardiaque de la souris à partir du jour 9 embryonnaire (Alcoléa et al., 1999; Coppen et al., 2003, 2001; Kumai et al., 2000). Chez la souris adulte, la Cx45 est localisée dans le nœud sinusal, les oreillettes, le nœud atrio-ventriculaire, les fibres de His et de Purkinje (Coppen et al., 1999) ainsi que dans les myocytes ventriculaires mais en plus faible quantité ($\approx 0.3\%$ des connexines totales ; (Bao et al., 2011)).

La Cx40 est exprimée dans les ventricules et les oreillettes à partir du jour 11 embryonnaire chez la souris (Delorme et al., 1995) puis son expression est retrouvée au niveau des oreillettes et du système de conduction (faisceau de His et fibres de Purkinje) et les oreillettes (Miquerol et al., 2004) chez la souris adulte.

La Cx43 est exprimée dans les ventricules durant le développement embryonnaire (dès jour 12.5 chez la souris) puis est exprimée dans les oreillettes, les ventricules et les fibres de Purkinje chez la souris adulte (Coppen et al., 2003).

La Cx30.2, orthologue murin de la Cx31.9 humaine (Belluardo et al., 2001) est exprimée au niveau des nœuds sinusal et atrio-ventriculaire et dans les fibres de His (Kreuzberg et al., 2005).

Les connexines sont majoritairement co-exprimées menant à des ratios de co-expression spécifique. En conditions physiologiques, les niveaux d'expressions des connexines varient au cours du développement et du vieillissement cardiaque. Par exemple, la Cx45 seule est retrouvée jusqu'au jour embryonnaire 11 où l'expression de la Cx40 est caractérisée (Alcoléa et al., 1999a; Delorme et al., 1997) chez la souris. De plus, les ventricules de souris adulte expriment environ 30 fois plus de Cx43 que de Cx45 (Bao et al., 2011a) tandis que le niveau d'expression de la Cx43 diminue dans les ventricules de souris âgées (23-24 mois) par rapport aux souris jeunes (4-10 mois, (Bonda et al., 2015; Rossi et al., 2008)).

En conditions pathologiques un remodelage (changement du niveau d'expression et latéralisation des connexines) peut être observé. Par exemple, en ischémies une diminution du niveau d'expression de la Cx43 et une latéralisation sont observées (Bruce et al., 2008), tandis qu'une augmentation du niveau d'expression de la Cx40 auriculaire est associée à la fibrillation atriale (Dupont et al., 2001). Ces remodelages ont un potentiel pro-arythmique illustré par exemple par une diminution de la vitesse de propagation du potentiel d'action ventriculaire observé suite à une diminution du niveau d'expression de la Cx43 (Gutstein et al., 2001; Paul et al., 2013).

h) Configurations et nomenclatures des canaux de jonctions

La co-expression peut donner lieu à la formation de demi-canaux et de canaux de jonctions de configurations différentes. Les demi-canaux composés d'une seule connexine sont dits homomériques et les demi-canaux résultant d'un assemblage de deux connexines ou plus sont appelés hétéromériques. Les canaux formés de deux demi-canaux identiques sont nommés

homotypiques et l'assemblage de deux demi-canaux de compositions différentes forme des canaux de jonctions hétérotypiques (Desplantez et al., 2004).

Par convention les canaux de jonction homomériques-homotypiques sont nommés homotypiques, les canaux de jonction homomériques-hétérotypiques sont appelés hétérotypiques et les canaux de jonction hétéromériques-homotypiques ou hétérotypiques sont nommés hétéromériques (Figure 15).

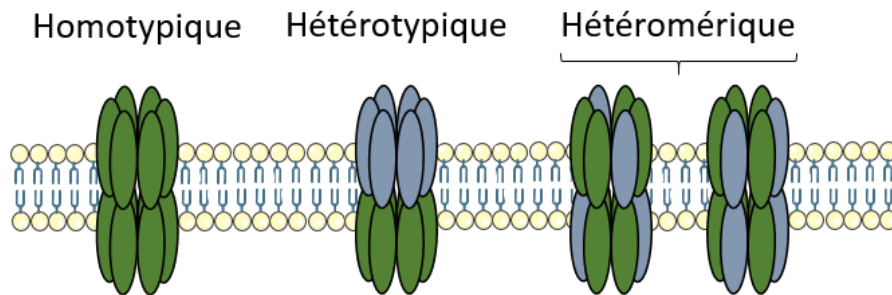


Figure 15 : Configurations possibles des canaux de jonction (Adaptée de Desplantez et al 2004).

i) Modifications post-traductionnelles

Des modifications post-traductionnelles (par ex. phosphorylations) peuvent réguler la demi-vie des connexines (par exemple la demi-vie de la Cx43 est de 1-3h, demi-vie courte par rapport aux autres protéines membranaires, (Beardslee et al., 1998; Laing et al., 1998; Laird et al., 1991; Musil and Goodenough, 1990)), et également modifier les propriétés électriques des canaux de jonctions.

i. Phosphorylations

De nombreuses études ont démontré une régulation biochimique et fonctionnelle par la phosphorylation des connexines (Atkinson et al., 1995; Cooper and Lampe, 2002; Cottrell et al., 2003; Lampe et al., 2000; Solan and Lampe, 2016; van Rijen et al., 2000; van Veen et al., 2000). La Cx43 reste à ce jour l'isoforme la plus étudiée pour laquelle il a été observé différents résidus cibles, principalement des sérines et tyrosines spécifiques situés dans le domaine C-terminal

(Figure 16, (Solan and Lampe, 2016)). De même, ces études ont montré des différences des effets des phosphorylations en fonction du type de kinase (par ex. PKA, PKC ; cf. ci-dessous) et du résidu ciblé (Figure 16). Par exemple, la phosphorylation de la Cx43 par la protéine kinase A (PKA) sur les sérines 364, 365, 369 et 373 du domaine C-terminal augmente le niveau d'expression (Atkinson et al., 1995), tandis qu'une phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) sur le résidu sérine 368 diminue la conductance unitaire (Cooper and Lampe, 2002; Cottrell et al., 2003; Lampe et al., 2000).

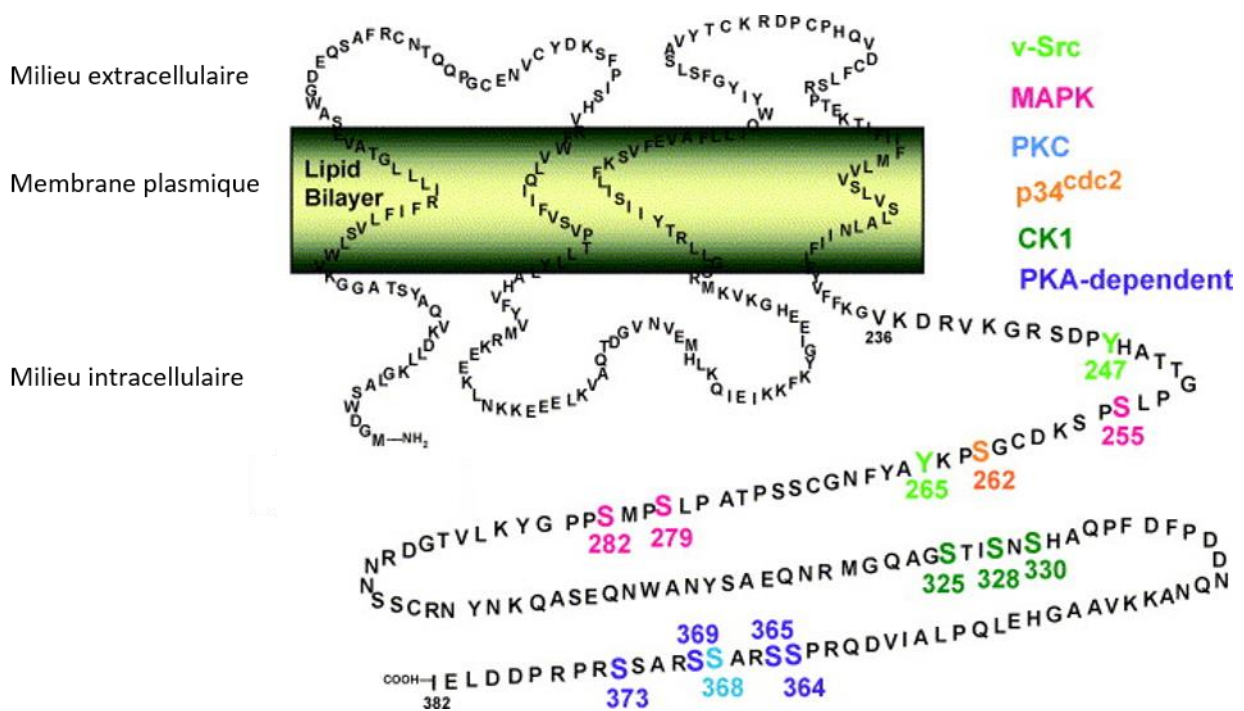


Figure 16 : Sites de phosphorylation de la Cx43. Les sites des différentes protéines kinases sont indiqués en couleur (vert : v-Src, rose : MAPK, bleu : PKC, orange : p34^{cdc2}, vert foncé : CK1 et violet : PKA). (Adaptée de Lampe P and Lau A, 2004).

Cette dépendance a aussi été observée pour la Cx40 et la Cx45. Par exemple, la phosphorylation de résidus sérines 381, 382, 384 et 385 dans le domaine C-terminale de la Cx45 par la PKA (Hertlein et al., 1998) réduit la probabilité d'ouverture des canaux et diminue le couplage électrique, au contraire de la phosphorylation par la PKC (van Veen et al., 2000).

Enfin, la Cx40 contient des sites de phosphorylations pour la PKA (acides aminés 342-345, (Hennemann et al., 1992)). La phosphorylation de ces résidus augmente la probabilité d'ouverture des canaux de jonction Cx40 et une augmentation du couplage électrique (van Rijen et al., 2000).

ii. Ubiquitylation

L'ubiquitylation lie une ubiquitine sur les connexines par l'activité de l'ubiquitine ligase Nedd4 au niveau du motif PY (acide aminés 282-286) du domaine C-terminale de la Cx43 déphosphorylée (Leykauf et al., 2006). La fixation de Nedd4 est inhibée par la phosphorylation de la MAPK sur les résidus S279 et S282 (Leykauf et al., 2006). Cette modification est impliquée dans la voie de dégradation protéasomale de la Cx43, et est un signal pour activer l'internalisation des Cx43 (Rivedal and Leithe, 2005), cf. ci-dessous).

iii. Acétylation

Les connexines peuvent également être acétylées. A ce jour de rares études ont montré que l'acétylation de la Cx43 induit sa latéralisation pathologique (Colussi et al., 2011) et diminue son niveau d'expression qui induit une diminution du couplage électrique (Meraviglia et al., 2015).

iv. Autres modifications post-traductionnelles

D'autres modifications post-traductionnelles ont été caractérisées dont la sumoylation qui consiste en l'ajout de protéines « small ubiquitin-like modifier » (SUMO) sur des résidus lysines de Cx43. Cette modification augmente son niveau d'expression et la communication métabolique intercellulaire (Kjenseth et al., 2012).

j) Voies de dégradation des connexines

Deux voies de dégradation des connexines ont été démontrées : la voie lysosomale et protéasomale.

i. voie lysosomale

La voie lysosomale des canaux de jonctions a été la première voie de dégradation décrite (Björkman, 1962). Cette voie consiste en la formation d'une vésicule à double membrane contenant les canaux de jonction appelée jonction annulaire (Jordan et al., 2001) qui, par invagination membranaire à partir du centre des jonctions, internalise les canaux de jonctions (Gaietta et al., 2002). Après l'internalisation les vésicules annulaires fusionnent avec les lysosomes et les canaux sont dégradés par les enzymes lysosomales.

L'internalisation des connexines par cette voie dépend de leurs modifications post-traductionnelles. Ainsi l'internalisation de la Cx43 dépend de sa phosphorylation. En effet, des expériences sur des myocytes ventriculaires de rat en culture ont montré une accumulation de Cx43 phosphorylée par la PKC (sur le résidu S368, (Lampe, 1994) au niveau de la jonction suite à une inhibition de la voie lysosomale qui suggère que l'internalisation de Cx43 par cette voie dépend de cet état phosphorylé (Beardslee et al., 1998) tandis que la Cx43 non phosphorylée n'est pas dégradée par cette voie.

ii. voie protéasomale

Les connexines peuvent suivre une deuxième voie de dégradation, qui implique les protéases. Là aussi, la Cx43 reste à ce jour la connexine la plus étudiée, qui est dégradée par cette voie suite à l'ubiquitinylation du domaine C-terminal sur le motif PY (Leykauf et al., 2006). De la même manière que l'étude de la voie lysosomale, l'implication de la voie protéasomale a été déterminée en utilisant des inhibiteurs de la voie protéasomale (par ex. le N-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al ou ALLN) dans des lignées cellulaires CHO (Laing and Beyer, 1995), et dans des myocytes en culture

(Beardslee et al., 1998). Ceci cause une accumulation de Cx43 jonctionnelle non phosphorylée et montrant que cette dernière est dégradée par la voie protéasomale.

III/ Propriétés électrophysiologiques des canaux de jonctions

Des modèles cellulaires permettent la caractérisation des propriétés électrophysiologiques des connexines en contrôlant le type et le niveau d'expression des connexines, tandis qu'une approche ex-vivo sur myocytes isolés permet un contrôle du type de connexines exprimées mais les niveaux d'expressions peuvent être plus difficiles à contrôler entre plusieurs préparations. Par exemple, les souris transgéniques « knock out (KO) » pour une connexines peuvent entraîner un décès des animaux à la naissance (Cx43KO, (Reaume et al., 1995)) ou pendant le développement embryonnaire (Cx45KO, (Nishii et al., 2003)). De plus, l'utilisation de KO inducible ne permet pas de diminuer à 100% l'expression de la connexine ciblée (Frank et al., 2012).

Les propriétés électriques sont caractérisées au niveau macroscopique par le couplage électrique intercellulaire, par la dépendance au potentiel de jonction et les cinétiques de désactivation et de restitution. et au niveau unitaire par les conductances unitaires la régulation de la formation des canaux de jonction.

a) Couplage électrique intercellulaire G_{j,0}

Le couplage électrique intercellulaire définit le flux ionique (courant) au travers de l'ensemble des canaux de jonctions et est impliqué dans la régulation de la propagation du potentiel d'action (Beauchamp, 2004; P. Beauchamp et al., 2006; Dhillon et al., 2013). Son amplitude dépend de la taille des jonctions, de la densité des canaux de jonction et de leurs propriétés biophysiques.

Les enregistrements électrophysiologiques ont montré que les canaux homotypiques ont un couplage électrique ($G_j,0$) maximal pour un potentiel de jonction nul (i.e. les cellules adjacentes sont au même potentiel de membrane. cf : matériels et méthodes) qui reflète une ouverture maximale de l'ensemble des canaux.

Au contraire, les canaux hétérotypiques et hétéromériques, en fonction de leurs compositions en connexines, peuvent présenter un $G_j,0$ intermédiaire (cf sensibilité des canaux de jonction au potentiel de membrane) entre un état d'ouverture maximum et résiduel (Desplantez et al., 2015, 2011).

b) Sensibilité des canaux de jonction au potentiel de jonction

i. Définition

La sensibilité des canaux de jonction au potentiel de jonction caractérise les propriétés biophysiques des canaux et des états de fermeture et d'ouverture en fonction du temps et de l'amplitude du potentiel de jonction. Elle se caractérise par trois paramètres : la dépendance au potentiel de jonction, les cinétiques de désactivation et les cinétiques de restitution.

ii. Dépendance au potentiel de jonction

La dépendance au potentiel de jonction définit le degré de fermeture des canaux de jonction en fonction du temps et de l'amplitude du potentiel de jonction. De très nombreuses études électrophysiologiques ont démontré que cette propriété est spécifique aux types de canaux formés.

1. Canaux homotypiques

Les canaux homotypiques ont une dépendance au potentiel symétrique par rapport à un potentiel de jonction nul. La Cx45 est la plus sensible, la Cx40 possède une sensibilité intermédiaire et la Cx43 est la moins sensible (Figure 17, (Desplantez et al., 2007, 2004)).

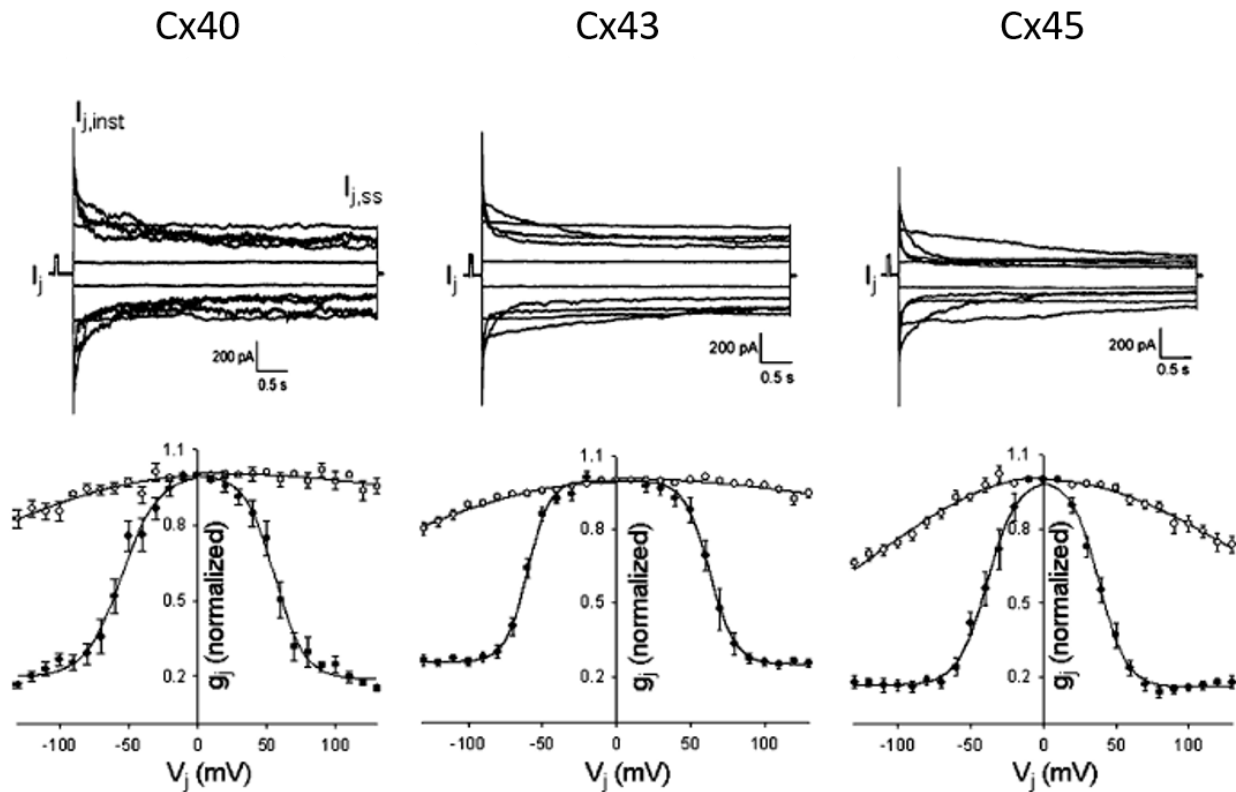


Figure 17 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux homotypiques (Adaptée de Desplantez T et al., 2007).

2. Canaux hétérotypiques

Les canaux hétérotypiques présentent une dépendance au potentiel de jonction asymétrique (rectifiante) par rapport à un potentiel de jonction nul (Figure 18), caractérisées par une augmentation ou une diminution de la conductance en fonction de la polarité du potentiel de

jonction. Ces propriétés reflètent les propriétés de chaque connexine dans chaque demi-canal adjacent, principalement la dépendance de celle-ci à la polarité et à l'amplitude de V_j .

La configuration la plus étudiée est celle des canaux de jonction Cx43-Cx45 qui montrent une forte diminution de la dépendance au potentiel de jonction pour des potentiels de jonctions négatifs ressenti par les demi-canaux Cx45 et une augmentation suivie d'une diminution de la dépendance pour des potentiels de jonctions positifs ressenti par les demi-canaux Cx43 (Figure 18). Ceci s'explique par une fermeture des demi-canaux Cx43 pour des potentiels de jonction positifs et une fermeture des demi-canaux Cx45 pour des potentiels de jonction négatifs (Figure 18, (Desplantez et al., 2004)). De plus, l'augmentation de la conductance de jonction pour des V_j positifs peut s'expliquer par une ouverture de canaux fermés à $V_j=0\text{mV}$. Cette hypothèse n'est possible que si l'on considère que les demi-canaux Cx45 inversent la polarité de fermeture des demi-canaux Cx43 (Desplantez et al., 2004; Moreno et al., 2002).

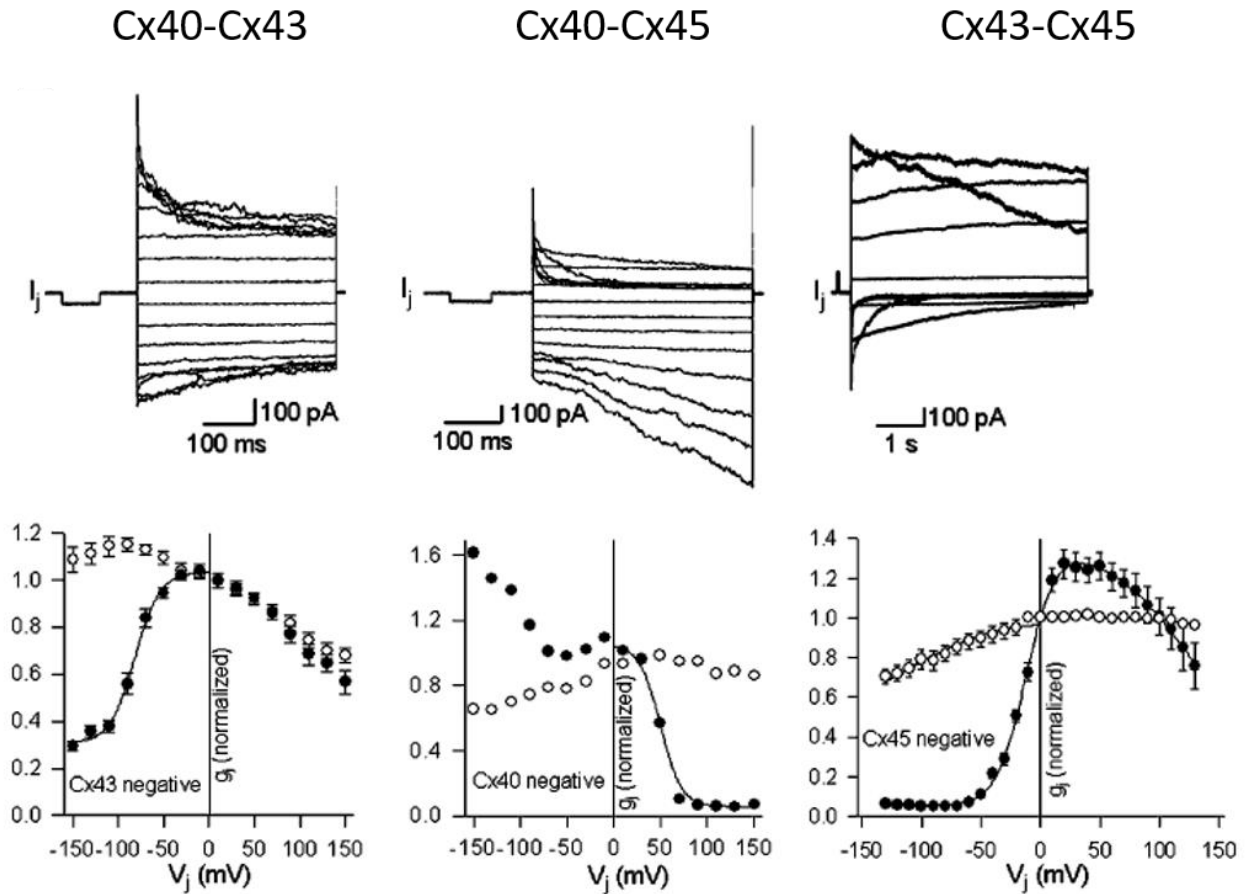


Figure 18 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux hétérotypiques (Adaptée de Desplantez T et al., 2007).

De même, la dépendance au potentiel de jonction des canaux Cx43-Cx40 montre une diminution forte pour des potentiels de jonctions négatifs ressentis par les demi-canaux Cx43 et modérée pour des potentiels de jonctions positifs ressentis par les demi-canaux Cx40. Dans cette configuration, ceci suggère une fermeture des demi-canaux Cx43 pour des potentiels de jonction négatifs (différent des canaux hétérotypiques Cx43-Cx45) et une fermeture des demi-canaux Cx40 pour des potentiels de jonctions positifs (Figure 18, (Cottrell et al., 2002)). De plus, la dépendance au potentiel de jonction positif ne correspond pas à celle observée pour la Cx40 homotypique suggérant une inhibition par la Cx43 (Cottrell and Burt, 2001).

Enfin, la dépendance au potentiel de jonction des canaux Cx40-Cx45 augmente pour des potentiels de jonction négatifs et diminue pour des potentiels de jonction positifs (Figure 18, (Rackauskas et al., 2007)). Ces résultats suggèrent une fermeture des demi-canaux Cx40 pour des potentiels de jonctions positifs et une fermeture des demi-canaux Cx45 pour des potentiels de jonctions négatifs. Ainsi, les potentiels de jonctions négatifs ressentis au niveau des demi-canaux Cx40 (et donc positifs pour les demi-canaux Cx45) entraînent une ouverture des canaux de jonctions illustré par une augmentation de la conductance de jonction.

3. Canaux hétéromériques

Les canaux hétéromériques ont été étudiés sur des paires de cellules co-exprimant au moins deux connexines (Cottrell et al., 2002; Desplantez et al., 2004; Koval et al., 1995; Polontchouk et al., 2002), tel que Cx43 et Cx45 (Figure 19 A, (Desplantez et al., 2004)) et Cx43 et Cx40 (Figure 19 B, (Valiunas et al., 2001)). Chaque paire de cellules examinées présentent un unique profil de courant de jonctions et de conductances de jonction en fonction du temps et de l'amplitude du potentiel de jonction caractérisés par des dépendances au potentiel de jonction symétriques et asymétriques (Figure 19). Ceci suggère la formation de canaux de jonctions homotypiques, hétérotypiques et hétéromériques. A ma connaissance aucune n'étude n'a été réalisée sur la co-expression de la Cx40 avec la Cx45. Un manque du contrôle des niveaux d'expression des différentes connexines dans chaque paire de cellules peut expliquer ces différences observées.

Cx43/Cx45-Cx43/Cx45

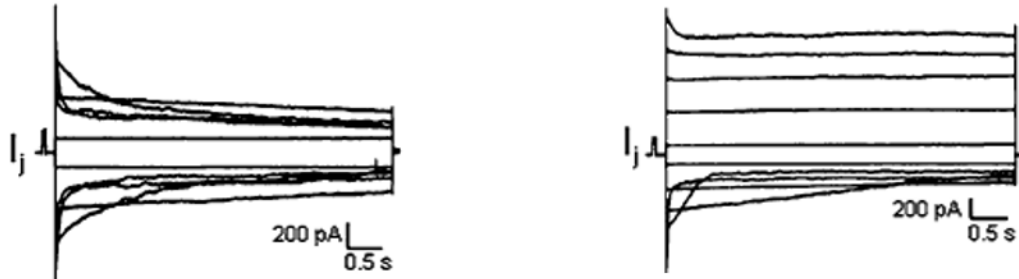
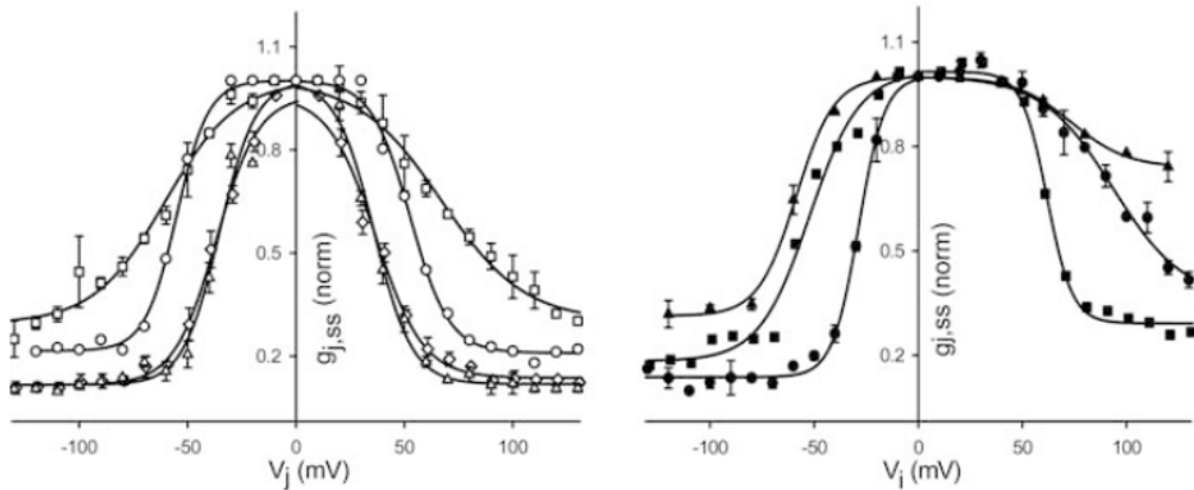
A**B**

Figure 19 : Dépendance au potentiel de jonction des canaux hétéromériques. **A** : Exemples de courants de jonctions symétriques (gauche) et asymétriques (droite) pour des co-expressions Cx43/Cx45. **B** : Exemples de dépendances symétriques (gauche) et asymétriques (droite) pour des co-expressions Cx43/Cx45. (Adaptée de Desplantez T et al., 2007).

De façon intéressante, l'ensemble des canaux de jonction, quelles que soient leurs configurations présentent une conductance de jonction résiduelle ($g_{j,ss} \neq 0$) pour de forts gradients de potentiel de jonction ($V_j > 100 \text{ mV}$, (Figure 17, 18 et 19, (Bukauskas et al., 1995; Desplantez et al., 2004; Moreno et al., 1995; V Valiunas et al., 2000a)). Cette propriété indique une ouverture résiduelle des canaux qui permet de maintenir un couplage résiduel intercellulaire.

iii. Cinétiques de désactivation

1. Définition

Les canaux de jonction présentent divers degrés de désactivation en fonction du temps et de l'amplitude du potentiel de jonction. Les différentes connexines montrent des cinétiques de désactivations spécifiques.

La Cx43 montre pour des potentiels de jonction de 0mV à ± 50 mV, une désactivation lente sans atteindre un état stable (Figure 20 A). Pour des potentiels de jonction compris entre ± 50 mV et ± 100 mV, une désactivation rapide est observée et atteint un état stable (Figure 20 B). Pour des potentiels de jonctions supérieurs à ± 100 mV, une désactivation rapide suivie par une désactivation lente qui atteint un état stable est observée (Figure 20 C). Les cinétiques de désactivations de la Cx45 possèdent le même profil que ceux de la Cx43 (Bukauskas et al., 2001; Desplantez et al., 2004). Ces cinétiques de désactivation peuvent être représentées sur la dépendance au potentiel de jonction de la Cx43 (Figure 21).

De même, les cinétiques de désactivations de la Cx40 montrent une cinétique de désactivation rapide à partir de $V_j = \pm 40$ mV tandis qu'une désactivation lente est observée à partir de ± 100 mV (Desplantez et al., 2011; Lin and Veenstra, 2004).

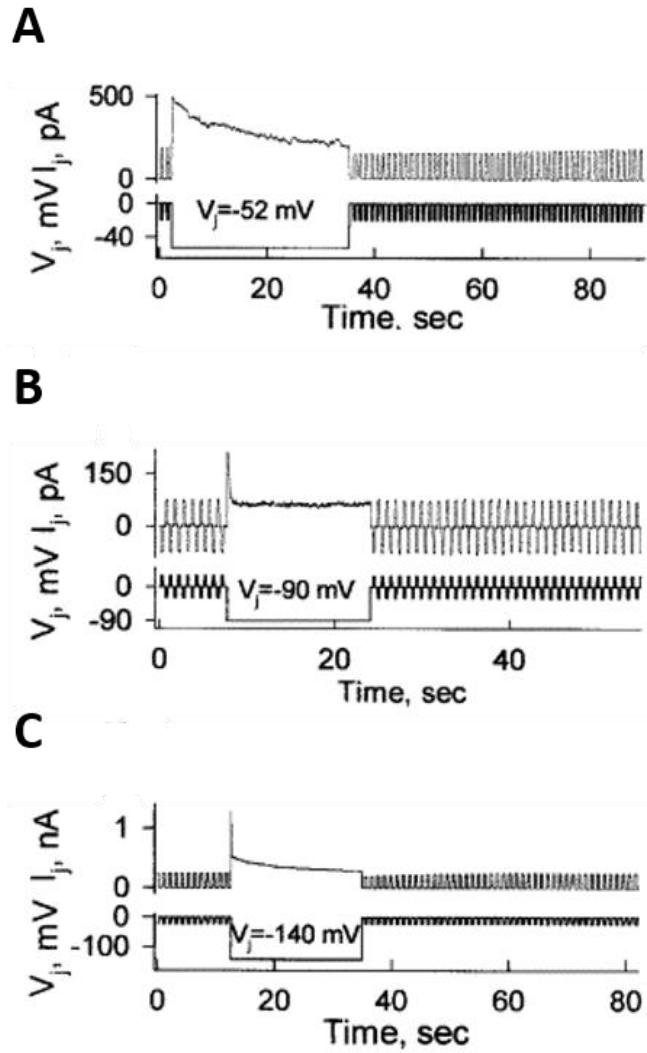


Figure 20 : Cinétiques de désactivations macroscopiques pour la Cx43. Exemples de I_j pour différentes amplitudes de potentiel de jonctions (A : $V_j = -52$ mV, B : $V_j = -90$ mV et C : $V_j = -140$ mV. (Adaptée de Bukauskas FF et al 2001).

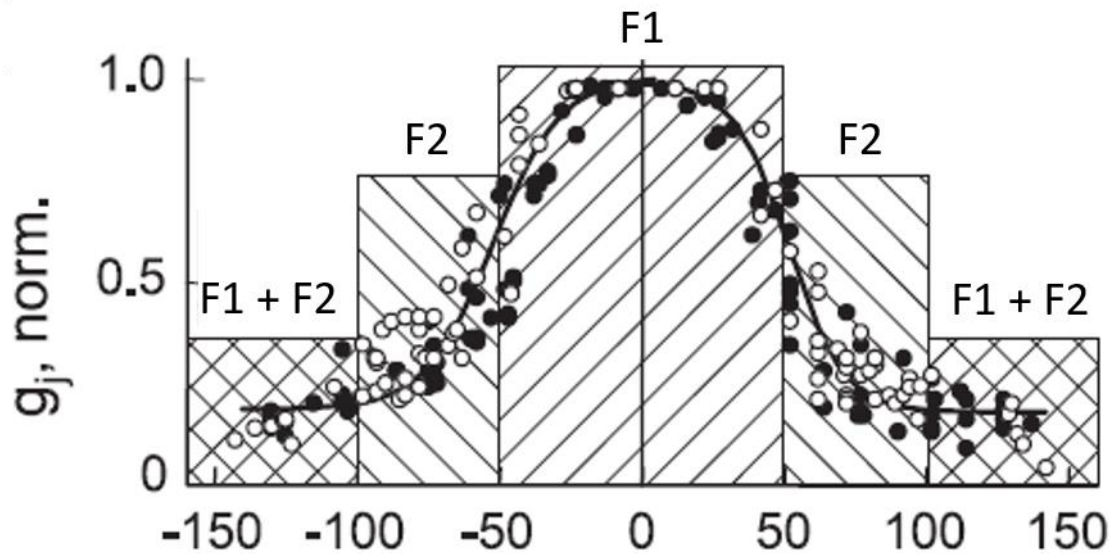


Figure 21 : Exemple des cinétiques de désactivation pour la Cx43. F1 correspond à la fermeture lente et F2 correspond à la fermeture rapide. (Adaptée de Bukauskas FF et Verselis VK, 2004).

Cela montre que deux mécanismes de fermeture (un rapide et un lent) indépendants sont impliqués dans la fermeture des canaux de jonctions dont les transitions peuvent être caractérisées dans des enregistrements de courant unitaires (Figure 20 D et Figure 21). Plus précisément, les canaux de jonction présentent un état d'ouverture principal et un état d'ouverture résiduel (cf. conductances unitaires) pour lesquels deux mécanismes sont impliqués : un rapide (de l'ordre de la milliseconde) qui assure la transition entre un état d'ouverture maximal principal et un état d'ouverture résiduel, et un lent (de l'ordre de la seconde) qui assure une transition entre un état ouvert et un état fermé (Figure 22, (Banach and Weingart, 2000; Bukauskas and Verselis, 2004)).

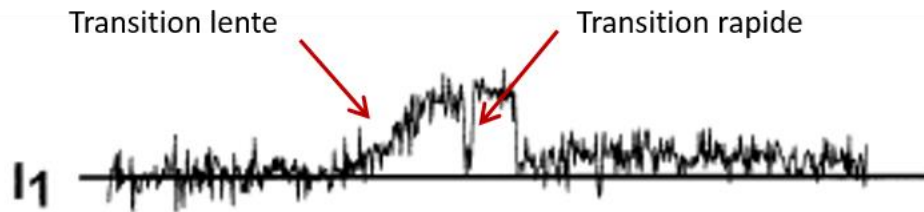


Figure 22 : Transitions rapide et lente observées sur un enregistrement de courant unitaire de canal de jonction homotypique Cx43. (Adaptée de Banach et Weingart, 2000)

2. Canaux homotypiques

Les canaux homotypiques servent de référence pour caractériser les cinétiques de désactivation de chaque type de connexines. Les canaux Cx45 possèdent la cinétique de désactivation rapide la plus rapide, les canaux Cx43 ont une cinétique intermédiaire et les canaux Cx40 ayant une cinétique la plus lente (Desplantez et al., 2011, 2004).

3. Canaux hétérotypiques

Des cinétiques de désactivation spécifiques ont aussi été observées pour les canaux hétérotypiques (Desplantez et al., 2011, 2004a; Elenes et al., 2001). A ma connaissance, à ce jour les canaux Cx43-Cx45 uniquement ont été étudiés. Plus particulièrement il a été démontré que ces cinétiques de désactivation reflètent la désactivation respective des demi-canaux Cx43 et Cx45 selon la polarité du potentiel de jonction. Plus précisément, les cinétiques de désactivation des demi-canaux Cx43 sont plus lentes dans les canaux hétérotypiques Cx43-Cx45 que dans les canaux homotypiques Cx43. Ceci est expliqué par une inhibition de la composante de fermeture rapide du demi-canal Cx43 par Cx45 (Elenes et al., 2001). Les cinétiques de désactivation pour les demi-canaux Cx45 ne semblent pas être affectées (Elenes et al., 2001).

4. Canaux hétéromériques

Tout comme la dépendance au potentiel de jonction, les canaux de jonction hétéromériques présentent de nombreux profils de cinétiques de désactivation. De manière similaire à la dépendance au potentiel de jonction, cela suggère une variation de la formation et des propriétés électriques des canaux de jonction entre les paires de cellules étudiées.

5. Mécanismes impliqués dans la désactivation des canaux de jonctions

Fermeture rapide :

Ce mécanisme opère dans l'ordre de la milliseconde ($\Delta t < 2\text{ms}$) (Banach and Weingart, 2000; Bukauskas et al., 2001; Bukauskas and Peracchia, 1997). Pour la Cx43, ce mécanisme répond à partir de $V_j = \pm 50\text{mV}$ (Bukauskas et al., 2000; Bukauskas and Verselis, 2004).

L'application d'un gradient de potentiel de jonction différent de 0mV va être ressenti par le « voltage sensor » situé au niveau du domaine N-terminal qui, en fonction de sa composition, détermine la polarité de fermeture (Ek Vitorín et al., 2016; Purnick et al., 2000). De plus, une proline (P87 pour la Cx32 et P88 pour la Cx43 par exemple) présente dans le domaine transmembranaire 2 confère une structure courbée à cette hélice qui détermine le diamètre intérieur du pore du canal (Ri et al., 1999). Un mouvement du domaine N-terminal vers l'intérieur du pore du canal, en réponse à un potentiel de jonction non nul entraîne un mouvement vers l'intérieur du pore du domaine transmembranaire 2 en augmentant sa courbure et ainsi diminue le diamètre du pore du canal. Ces mouvements entraînent une transition du canal de l'état principal à l'état résiduel (Figure 23, cf. conductances unitaires). En complément, des études suggèrent une interaction de type « ball and chain » entre le domaine C-terminal et les acides aminés 119 à 144 de la boucle intracellulaire (nommé domaine « L2 ») de la Cx43 (Anumonwo et al., 2001; Liu et al., 2006; Moreno et al., 2002; Seki et al., 2004; Shibayama et al., 2006).

Fermeture lente :

Ce mécanisme est dit lent car il opère plus lentement que le mécanisme rapide ($>10\text{ms}$, (Banach and Weingart, 2000; Bukauskas et al., 2001)). Le mécanisme de fermeture lente ou « loop gating » répond pour de faibles amplitudes du potentiel de jonction ($<\pm 50\text{mV}$) induisant une désactivation des canaux. Pour des potentiels de jonctions intermédiaires, le mécanisme de fermeture rapide répond en premier, diminuant l'amplitude du potentiel de jonction ressenti par le « voltage sensor » du mécanisme de fermeture lente. Ceci inhibe la fermeture lente pour des amplitudes de potentiel de jonction de $\pm 50 < V_j < \pm 100\text{mV}$. Pour des potentiels de jonctions supérieurs à $\pm 100\text{mV}$, le potentiel de jonction ressenti par le « voltage sensor » de la fermeture lente suffit à activer ce mécanisme de fermeture lente (Bukauskas et al., 2000).

Ce mécanisme met en jeu un mouvement du domaine transmembranaire 1 et de la boucle extracellulaire 1 vers l'intérieur du pore (Tang et al., 2009; Trexler et al., 1996) et entraîne la fermeture totale du canal de jonction (Figure 23). De plus, il est supposé que cette fermeture maintient les demi-canaux fermés quand ils ne sont pas assemblés en canaux de jonction (Kwon et al., 2013).

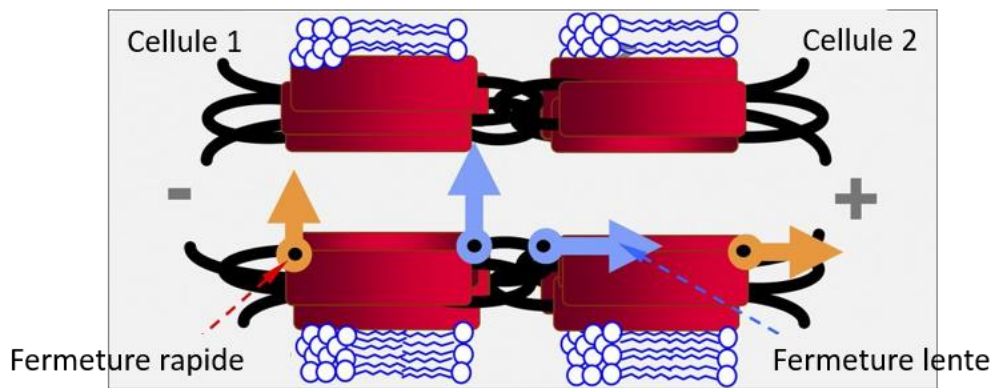


Figure 23 : Localisation des mécanismes de fermeture rapide et lente dans les canaux de jonctions. Le mécanisme de fermeture rapide est localisé au niveau de la face cytoplasmique du canal de jonction tandis que la fermeture lente est au niveau central du pore. (Adaptée de Snipas M et al., 2016).

iv. Cinétiques de restitution

La restitution décrit le retour à un état d'ouverture des canaux de jonction suite à une désactivation. Le mécanisme et les cinétiques de restitution ont été peu étudiés à ce jour et font partie de mes travaux de thèse afin d'améliorer notre connaissance à ce sujet. Les observations majeures de mes travaux suggèrent un mécanisme similaire mais inversé à celui de la désactivation (cf résultats et conclusions).

c) Conductances unitaires

i. Définition

Cette propriété représente les états unitaires d'un canal de jonction caractérisés par trois états : un état d'ouverture maximal, un état d'ouverture résiduel et un état fermé. Ces états sont caractérisés par des conductances unitaires : γ_m pour l'état d'ouverture maximale, γ_r pour l'état d'ouverture résiduelle et nulle pour l'état fermé. Les valeurs de γ_m et γ_r dépendent de la composition en connexines et de la configuration des canaux.

ii. Canaux homotypiques

Les canaux homotypiques présentent une γ_m et γ_r spécifique à chaque connexine. La Cx43 possède un $\gamma_m \approx 60-120\text{pS}$ et $\gamma_r \approx 18-24\text{pS}$ (Bukauskas et al., 2000; Elenes et al., 2001; V Valiunas et al., 2000a; Valiunas et al., 1997), la Cx40 a un $\gamma_m \approx 130-180\text{pS}$ et $\gamma_r \approx 27\text{pS}$ (Cottrell and Burt, 2001; V Valiunas et al., 2000a) et la Cx45 a $\gamma_m \approx 27-38\text{pS}$ et $\gamma_r \approx 4-11\text{pS}$ (Elenes et al., 2001; van Veen et al., 2000) (Figure 24, (Desplantez et al., 2011)). Les différences observés dans les études dépendent du modèle cellulaire d'expression et de la composition ionique du milieu (V. Valiunas et al., 2000).

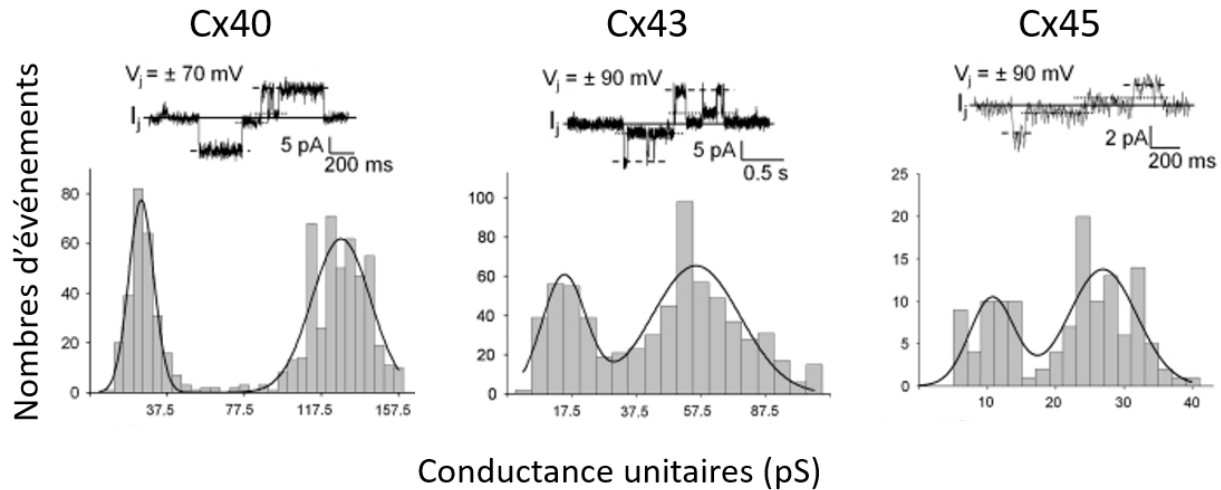


Figure 24 : Exemples de courants unitaires et fréquences de distribution des conductances unitaires des canaux homotypiques. (Adaptée de Desplantez T et al., 2007).

iii. Canaux hétérotypiques

Les conductances unitaires des canaux hétérotypiques Cx43-Cx45 et Cx43-Cx40 ont été observées par enregistrements sur paires de cellules mixtes, où chaque cellule exprime une isoforme différente. Les conductances unitaires des canaux de jonctions Cx43-Cx45 sont intermédiaires aux conductances unitaires des canaux de jonctions homotypiques Cx43 et Cx45. Les canaux de jonction hétérotypiques Cx43-Cx40 montrent une asymétrie de l'amplitude des courants et conductances de jonctions unitaires en fonction de la polarité du potentiel de jonction (Figure 25). Les conductances unitaires caractérisées sont intermédiaires aux conductances unitaires des canaux homotypiques Cx43 et Cx40.

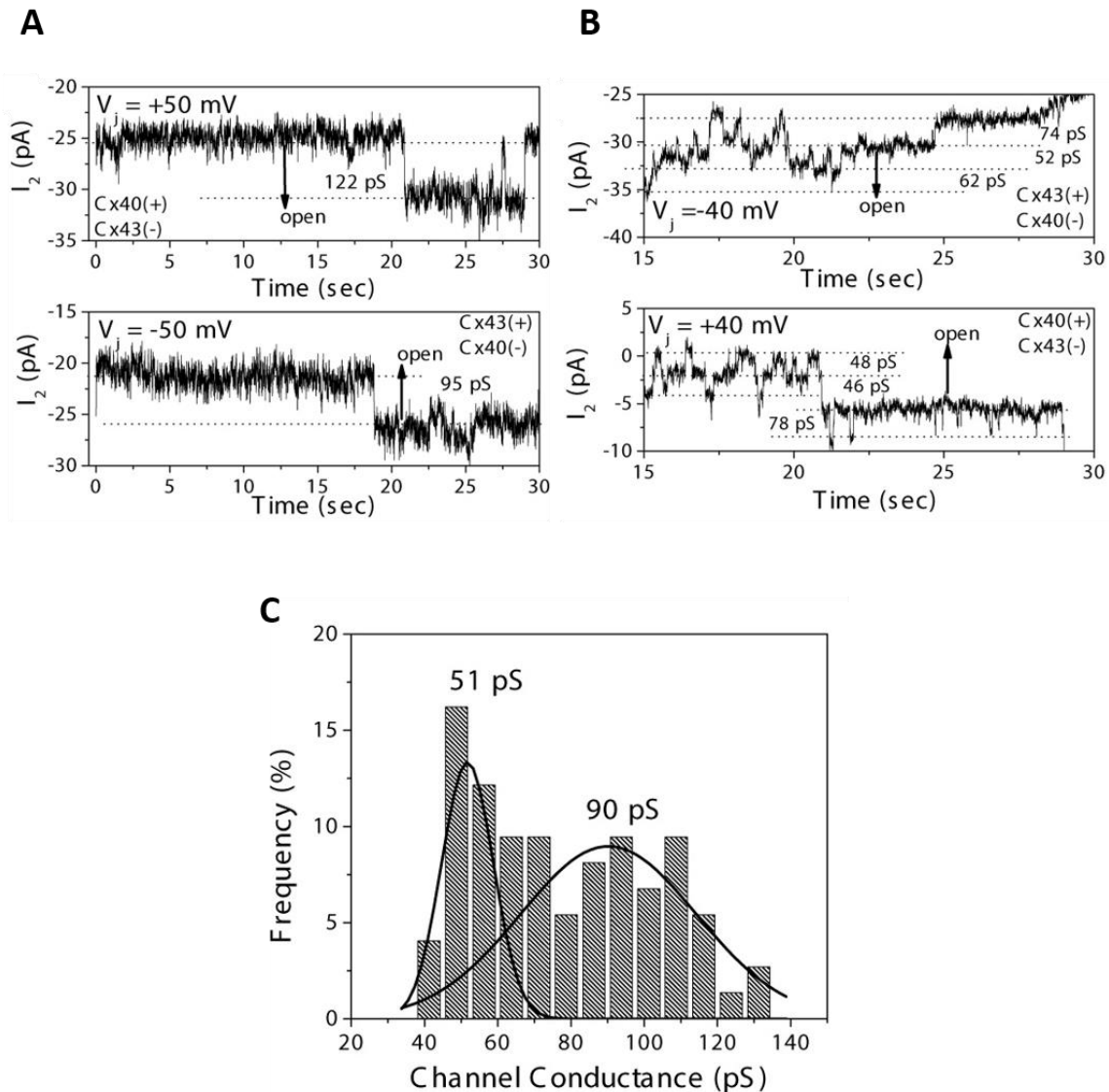


Figure 25 : Courants et conductances unitaires des canaux hétérotypiques Cx43-Cx40. **A** et **B** : exemples de courants de jonction unitaires présentant des conductances différentes en fonction des polarités du potentiel de jonction. **C** : fréquences de distribution. (Adaptée de Lin X et al., 2014).

iv. Canaux hétéromériques

Les canaux hétéromériques montrent une variabilité des conductances unitaires qui reflète une diversité de canaux de jonctions formés (Figure 26). De manière similaire aux propriétés macroscopiques, les valeurs de conductances unitaires sont intermédiaires ou identiques aux

valeurs des canaux homotypiques des connexines correspondantes composant les canaux hétéromériques.

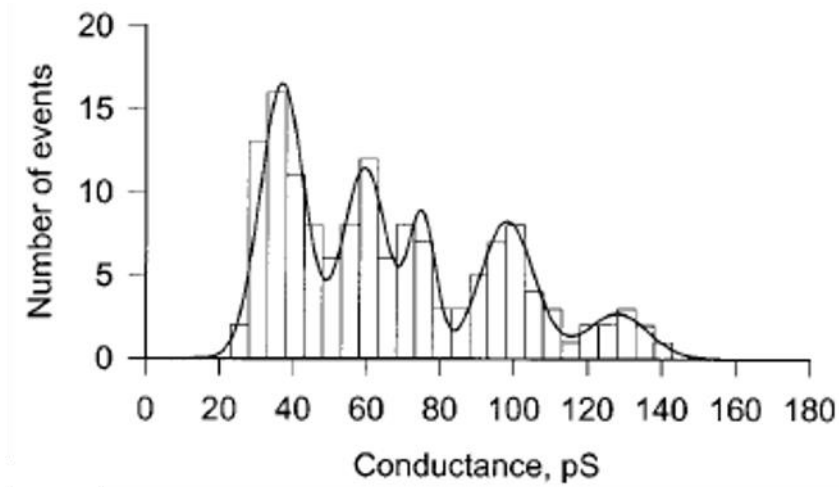


Figure 26 : Fréquence de distribution des conductances unitaires des canaux hétéromériques Cx43/Cx40. (Adaptée de Valiunas et al 2001).

Objectifs

Les connexines cardiaques sont co-exprimées avec des niveaux d'expressions spécifiques menant à des ratios spécifiques. Des changements de ces niveaux et donc des ratios sont observés dans des conditions physiologiques et pathologiques. Les études précédentes montrent qu'en fonction des niveaux d'expression et du type des connexines, différentes configurations de canaux de jonctions peuvent être obtenues (Desplantez et al., 2015, 2007, 2004; Martinez et al., 2002; Valiunas et al., 2001), qui suggère que le niveau d'expression détermine la composition des canaux de jonction. De plus, les propriétés électriques résultantes de cette formation spécifique sont considérées comme un des facteurs clés de la régulation de la propagation du potentiel d'action cardiaque (Beauchamp, 2004; Beauchamp et al., 2012; Lin et al., 2010).

Malgré ces avancées une limite majeure de ces études est l'absence du contrôle précis du niveau d'expression des connexines. Nous avons étudié l'influence de ratio Cx43:Cx45 précis afin de mieux comprendre l'importance de ces ratios pour des conditions physiologiques et pro-arythmique.

Pour cela, notre étude se base sur l'hypothèse que :

Les différents ratios de co-expression des connexines régulent une formation de canaux de jonctions spécifiques qui possèdent des propriétés électriques distinctes.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons adressé les questions suivantes :

1. Quels types de canaux sont formés aux différents ratios de co-expression de Cx43 et Cx45 ?
2. Est-ce que ces canaux possèdent des propriétés électriques différentes à chaque ratio ?
3. Quelles sont les contributions de chaque type de connexine dans ces régulations ?
4. Est-ce que ces régulations dépendent du type de connexines (par ex. co-expression Cx43 + Cx40) ?
5. Quelle est la contribution des canaux formés et leurs propriétés dans la régulation du potentiel d'action ?

Brièvement, afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé le modèle des cellules épithéliales de foie de rat qui expriment de manière endogène la Cx43 et qui ont été transfectées pour exprimer la Cx45. Ainsi nos enregistrements électrophysiologiques sur paires de cellules par la méthode de double voltage clamp nous ont permis de caractériser les propriétés électriques macroscopiques et unitaires à 4 ratios différents de Cx43:Cx45.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux propriétés électriques dans le cas de paires de cellules suite à une induction de l'expression de Cx45. Cette étude a mené à la soumission d'un article intitulé :

Electrical properties of gap junction channels: dependence on the ratio of co-expressed connexins Cx43 and Cx45.

Dans un second temps nous avons étudié les propriétés électriques des canaux dans des paires de cellules co-exprimant Cx43 et Cx45 mais aussi suite à une diminution du niveau d'expression de la Cx43.

Matériels et Méthodes

I/ Culture cellulaire

a) Lignée cellulaire

La lignée cellulaire épithéliale de foie de rat (RLE, Figure 27), qui exprime de manière endogène la Cx43, a été utilisée.

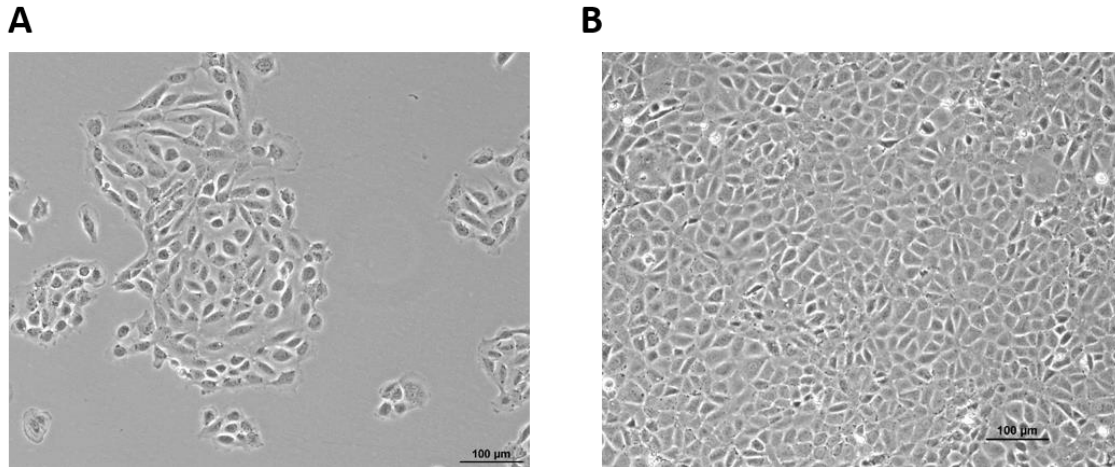


Figure 27 : Photos de cellules RLE en culture. A : cellules RLE à environ 15% de confluence. B : cellules RLE à confluence. Grossissement x100.

Les cellules ont été conservées dans un incubateur (37°C, 5% CO₂) sous atmosphère humide et maintenues dans du milieu de culture complété: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) non complété 4,5g/l glucose, Sérum Bovin Fœtal (SBF) 10%, Pénicilline/Streptomycine 100U/ml et glutamine 2mM. A confluence, les cellules ont été détachées par ajout de trypsine pendant 3 min puis ont été prélevées et centrifugées à 800 rpm pendant 5 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 ml de milieu de culture complété. Une partie des cellules a été réensemencée au 1/40^{ème} dans une flasque T25 contenant 5ml de milieu complété avec ou sans ponastérone A. La seconde partie des cellules a été utilisée pour les enregistrements électrophysiologiques de double voltage clamp, et la caractérisation biochimique (western blot et immunofluorescence) :

Double voltage clamp : Les cellules ont étéensemencées 24 à 48h avant expériences au 1/6^{ème} et 1/12^{ème}, respectivement, sur des lamelles en verre contenues dans une boîte de pétri 35mm et maintenues dans un incubateur en présence de milieu de culture complémenté avec ou sans ponastérone A selon les conditions expérimentales.

Immunofluorescence : Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles en verre dans une plaque 24 puits pour les jours 1, 2, 3 et 4 au 1/6^{ème}, 1/12^{ème}, 1/24^{ème} et 1/48^{ème} respectivement dans du milieu complémenté avec ou sans ponastérone A.

Western blot : Deux flasques T25 par conditions ont été préparées 24 à 48h avant les expériences.

b) Système ecdysone

Les cellules ont été transfectées de manière stable par lipofection par le système inductible Ecdysone (Figure 28, Invitrogen). Une double transfection a été réalisée (Halliday et al., 2003) avec un plasmide (pERV3, Figure 28) contenant les séquences codantes pour les facteurs de transcriptions VgEcR et RxR, et un second plasmide codant pour la Cx45 et la résistance à l'hygromycine B (Figure 29). La séquence Internal Ribosomic Entry Site (IRES), présente dans le plasmide codant pour la Cx45, permet une expression homogène de la Cx45 dans la population cellulaire en connectant les séquences de la Cx45 et de la résistance à l'hygromycine B, tout en permettant une traduction séparée des deux protéines (Halliday et al., 2003). Ainsi lorsque la Cx45 est exprimée, la résistance à l'hygromycine B est également exprimée. Sans ponastérone A, le complexe protéique composé de RxR/VgEcR est lié à un corépresseur inhibant la transcription des gènes d'intérêts. L'ajout de ponastérone A dans le milieu permet le remplacement du corépresseur du complexe protéique VgEcR/RxR par un coactivateur afin d'initier la transcription des gènes codants pour la Cx45 et la résistance à l'hygromycine B (Figure 30). Le niveau d'expression de Cx45 a été déterminé par la concentration en ponastérone A (Figure 31) : plus la concentration est importante, plus le niveau d'expression de la Cx45 est important et est maximal pour une concentration de 2µM (Grikscheit et al., 2008). La pression de sélection positive a été maintenue par l'ajout d'hygromycine B à 250µg/ml dans le milieu de culture. Quatre conditions

de cultures ont été utilisées : contrôle (sans induction) et 3 niveaux d'induction: 0,5, 1 et 2µM de ponastérone A

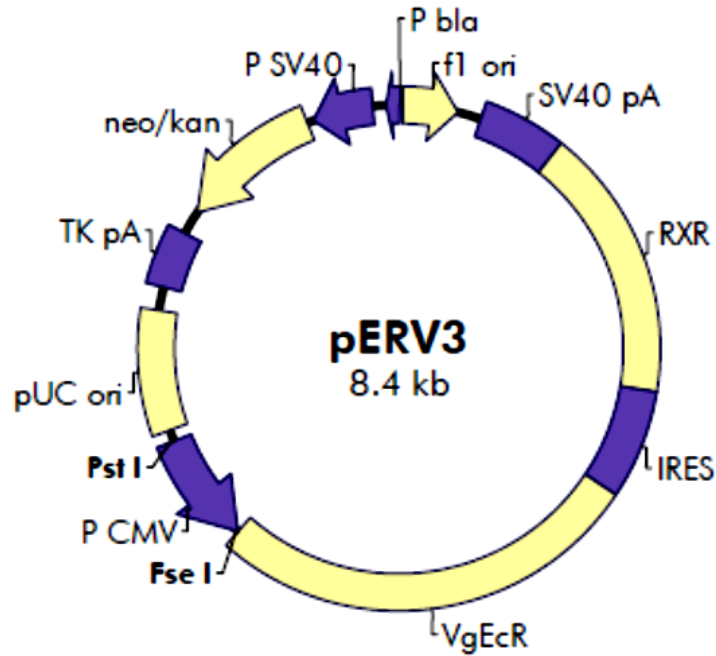


Figure 28 : Carte du vecteur pERV3 (Agilent Technologies). Le vecteur contient différentes séquences d'origine de réplication (f1 ori, pUC ori), de clivage pour les enzymes de restriction (Fse1, Pst1), de poly-adénylation (SV40 pA, TK pA), de résistance aux antibiotiques (neo/kan), promotrices (P CMV, P SV40, P bla), IRES (cf paragraphe b.) et codantes pour les protéines d'intérêts (RxR, VgEcR).



Figure 29 : Schéma du système ecdysone. Le vecteur contient un promoteur Ind pour la fixation des facteurs de transcriptions (RxR/VgEcR), les séquences codantes des gènes de Cx45 et de la résistance à l'hygromycine B à l'ensemble de la culture. (Adaptée de Haliday D et al., 2003).

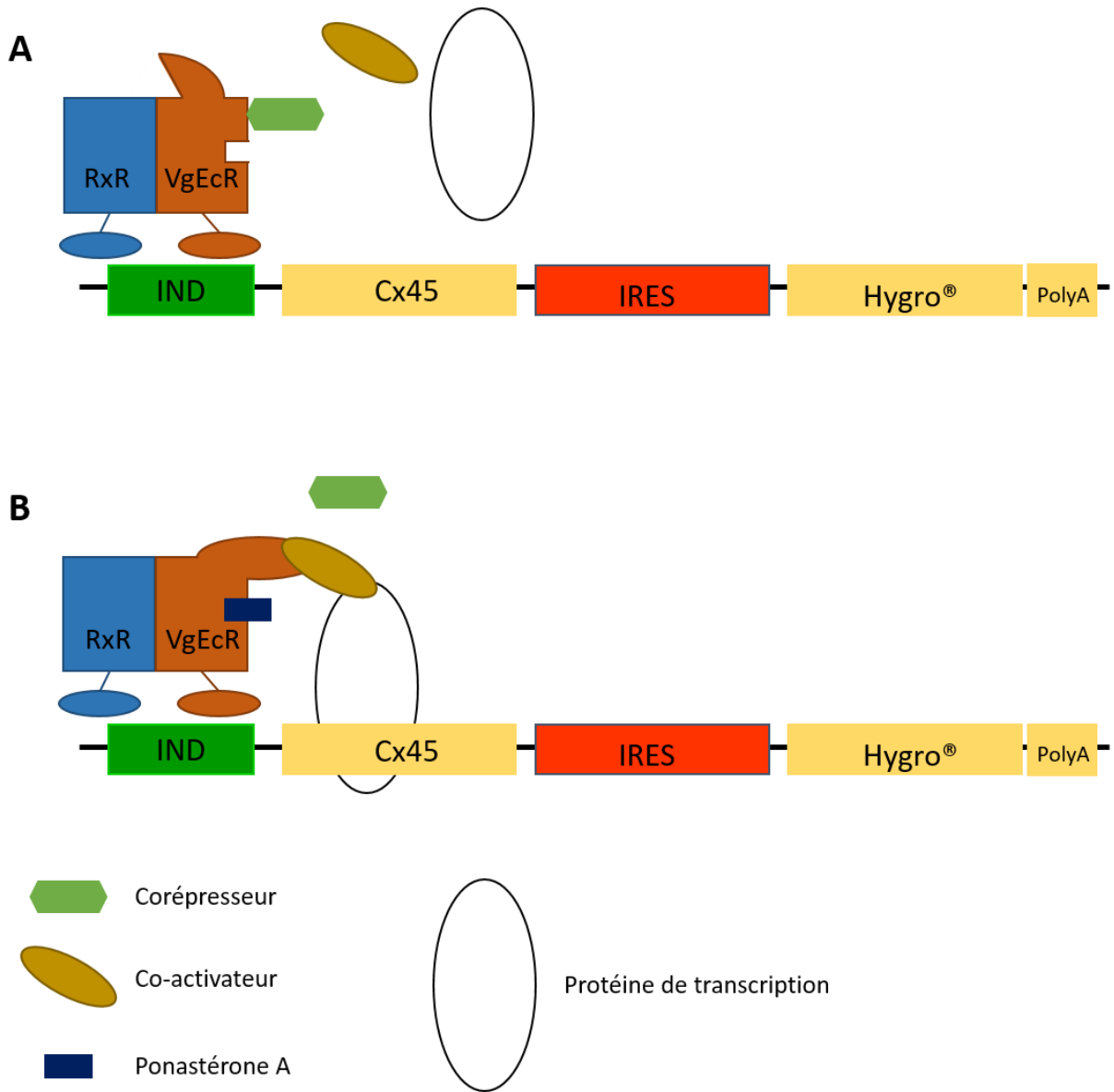
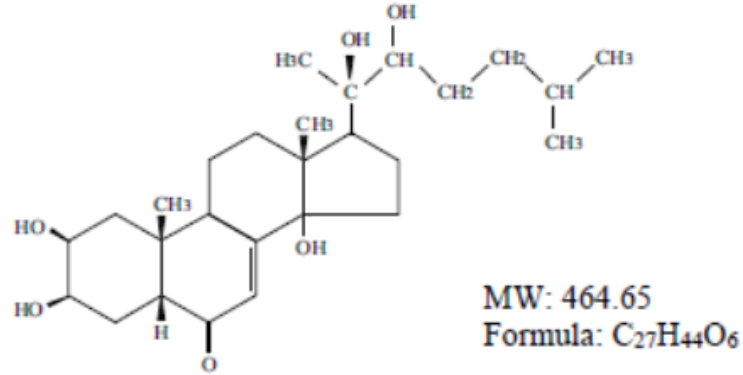


Figure 30 : Régulation de la transcription par le système Ecdysone. **A** : En l'absence de ponastérone A, un corépresseur empêche l'expression du gène d'intérêt. **B** : En présence de ponastérone A, le co-activateur est recruté rendant le complexe VgEcR/RxR actif et initiant la transcription (Agilent Technologies). (Adaptée de Haliday D et al., 2003).



Ponasterone A

Figure 31 : Formule chimique de la ponastérone A.

II/ Caractérisation biochimique

a) ARN interférence (ARNi) anti-Cx43

L'extinction de l'expression de la Cx43 a été réalisée par l'utilisation d'ARNi (Figure 32) spécifique dirigée contre la Cx43 (Life Technologies).

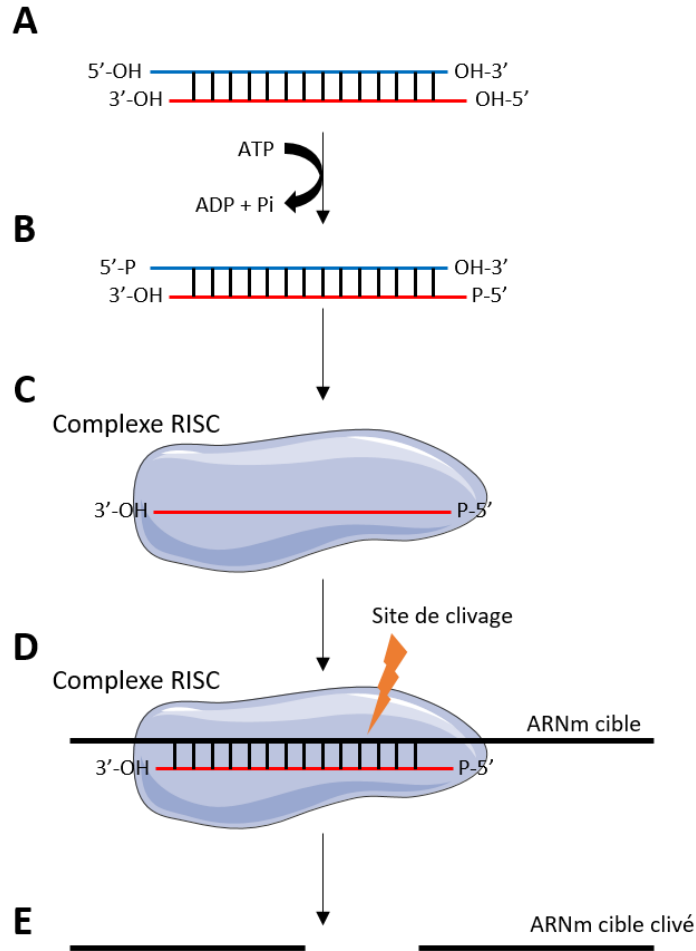


Figure 32 : Schéma du mécanisme d'extinction d'ARN messager (ARNm) par ARNi. L'ARNi synthétique double brin (A) est phosphorylé par la protéine Dicer (B) puis inséré dans le complexe de clivage induit par ARN (RNA-induced silencing complex ou RISC). Cette activation du complexe RISC induit une séparation des brins de l'ARNi afin de conserver le brin complémentaire de l'ARNm voulu (C). L'ARNm cible complémentaire de l'ARNi est incorporé dans le complexe RISC (D) et clivé (E). (Sébastien Dupuis).

b) Electroporation

Des RLE ont été trypsinées puis centrifugées et resuspendues dans 1ml de DMEM non complété. Un volume de 200µl à 400µl a été déposé dans une cuvette d'électroporation en fonction du volume final nécessaire pour les expériences. La mort cellulaire a été estimée à ≈50% lors d'une électroporation, le volume d'ensemencement des cellules a été doublé pour palier la perte due à la mort cellulaire. Les cellules ont été électroporées (Figure 33, électroporateur : ECM

830, BTX Harvard Apparatus) en présence de $2\mu\text{M}$ d'ARNi anti-Cx43 et en utilisant les paramètres: voltage= 280V , résistance= $100\text{M}\Omega$ et capacité= $200\mu\text{F}$ à $400\mu\text{F}$ en fonction du volume présent dans la cuvette d'électroporation.

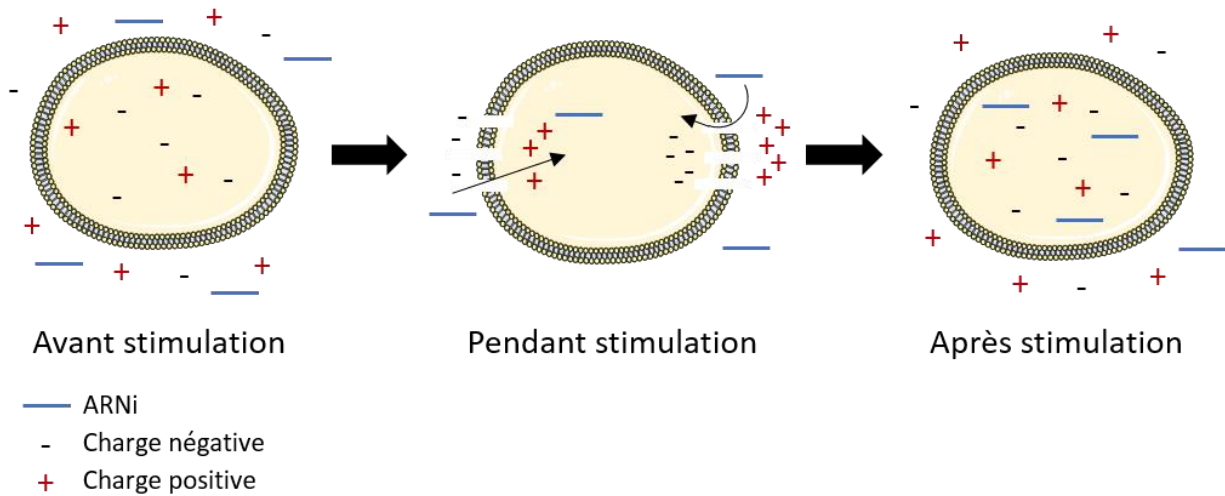


Figure 33 : Principe d'électroporation. Avant la stimulation électrique, les cellules sont maintenues dans du milieu de culture non complété en présence d'ARNi anti-Cx43. Lors de la stimulation, le champ électrique créé permet l'ouverture de pores temporaires dans la membrane plasmique et le passage d'ARNi à l'intérieur de la cellule. Après la stimulation électrique, les cellules retrouvent une membrane plasmique intacte. (Sébastien Dupuis).

Des électroporations contrôles (EPC) sans ajout d'ARNi anti-Cx43 ont été réalisés dans des conditions d'électroporation identiques.

c) Immunofluorescence

La distribution cellulaire de Cx43 et Cx45 et la diminution du niveau d'expression de la Cx43 par ARNi anti-Cx43 a été vérifiée par immunofluorescence (Figure 34). Les jours 1 à 4 ont été étudiés permettant d'observer l'évolution du niveau d'expression de Cx43. Au jour voulu, les cellules ont été rincées au Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X) puis fixées et perméabilisées par ajout de méthanol froid (mis à -20°C au préalable) pendant 5min. Deux rinçages PBS 1X ont été effectués

et l'anticorps primaire anti-Cx43 (monoclonal de souris dirigé contre la partie C-terminal de Cx43 ; MERCK millipore #MAB3067) dilué au 1/250^{ème} ou l'anticorps primaire anti-Cx45 (monoclonal de lapin dirigé contre le domaine C-terminal de Cx45 ; Alpha Diagnostic CX45-A) dilué au 1/200^{ème} a été ajouté dans une solution PBS 1X/BSA 1% à 4°C pendant 24 heures. Un second rinçage au PBS 1X a été réalisé et l'anticorps secondaire (âne anti souris couplé à la FITC ; Jackson ImmunoResearch Laboratories inc) dilué au 1/1000^{ème} l'anticorps secondaire (chèvre anti lapin couplé à la TRITC ; Jackson ImmunoResearch Laboratories inc) dilué au 1/1000^{ème} a été ajouté dans une solution PBS 1X/BSA 1% pendant 1h30. Deux rinçages PBS 1X ont été effectués et les cellules ont été conservées à 4°C dans du PBS 1X. Les lamelles ont été prélevées et montées sur des lames en verre avec du prolong puis observées au microscope (Nikon eclipse Ti-U). Les images ont été prises par la caméra DS-Qi1Mc (Nikon) et le logiciel NIS-Elements Basic Research (Nikon).

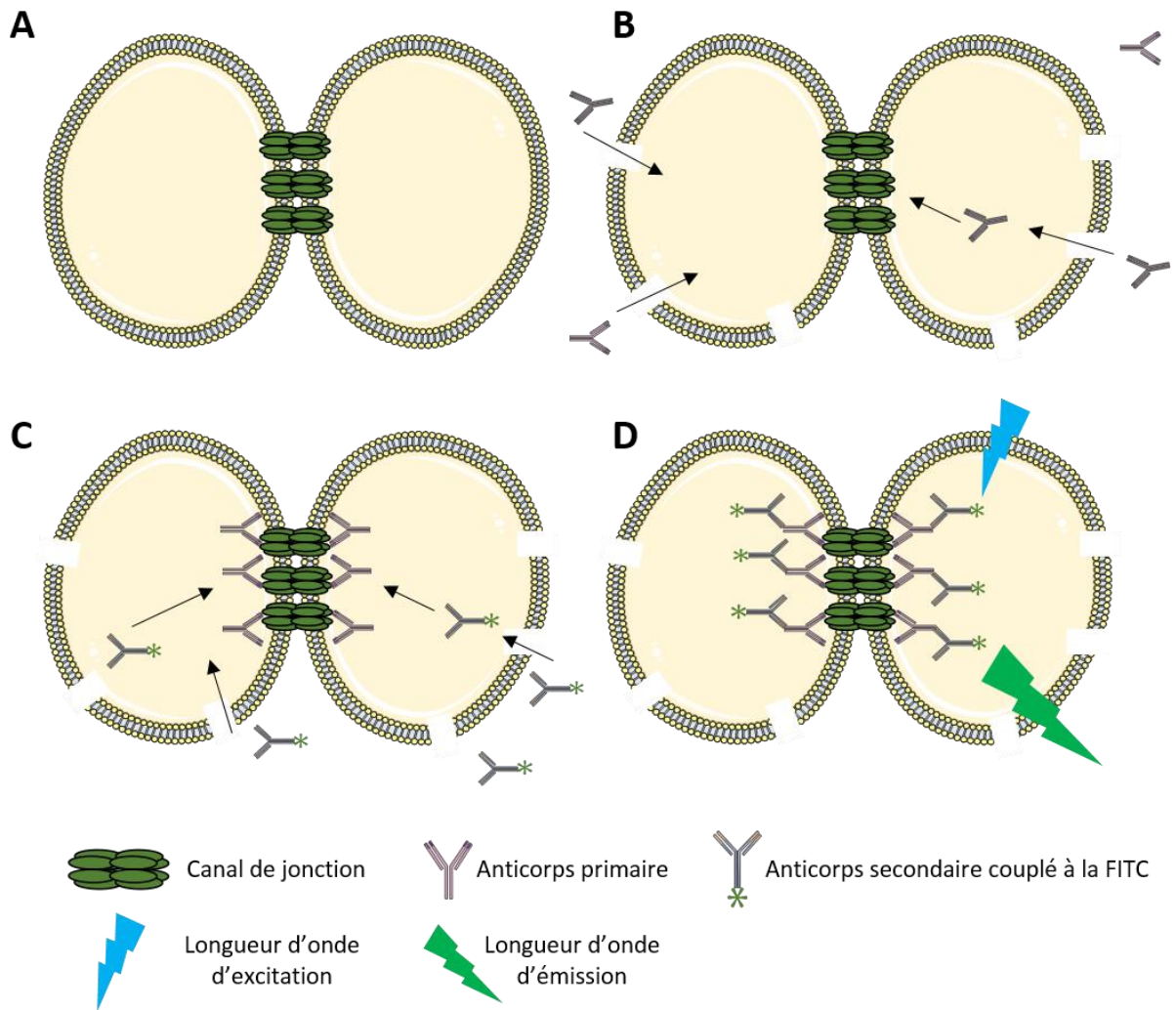


Figure 34 : Schéma du principe d'immunofluorescence. Les cellules (A) ont été perméabilisées puis incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la partie C-terminal intracellulaire de la Cx43 (B). Un anticorps secondaire (C) dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la FITC a été ajouté. L'excitation de la FITC se fait à une longueur d'onde de 490nm (bleu) et son émission est observée à 525nm (vert, D). (Sébastien Dupuis).

d) Western blot

L'expression de Cx43 et Cx45 a été contrôlée par western blot. Les cellules à confluence ont été grattées dans 2ml de PBS 1X et récupérées dans un tube de 15 ml. Deux lavages successifs avec du PBS 1X ont été réalisés par centrifugation (i) 1000 rpm ; 10 min ; 4°C ; puis ii) 4000 rpm 10 min 4°C en éliminant le surnageant après chaque lavage. La lyse cellulaire a été réalisée en présence de tampon de lyse de composition : RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay, Sigma) 200 µl/tube +

inhibiteur de protéases 2µl/tube + inhibiteur de phosphatases 2 µl/tube pendant 1h à 4°C. Le lysat a été centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C et le surnageant a été récupéré.

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode BiCinchoninic acid Assay (BCA). Une gamme étalon d'Albumine Sérique Bovine (BSA à partir de BSA à 2 mg/ml) a été réalisée avec les concentrations de BSA (en mg/ml) : 0 ; 0,0125 ; 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,375 ; 0,5. 3µl de tampon de lyse a été ajouté pour chaque concentration de BSA, puis complété pour une q.s.p. à 40µl avec de l'eau distillée (Tableau 2). 40 µl de lysat cellulaire ont été également dosés. Le dosage est calculé par mesure de densité optique (D.O.) rapportée à la gamme étalon afin d'estimer la quantité de protéines totales de chaque échantillon.

Concentration BSA (µg/µl)	0	0,0125	0,0625	0,125	0,25	0,375	0,5
BSA (µl)	0	0,5	2,5	5	10	15	20
Tp lyse (µl)	3	3	3	3	3	3	3
H2O qsp 40µl (µl)	37	36,5	34,5	32	27	22	17

Tableau 2 : Gamme étalon de BSA utilisée pour le dosage des protéines par la méthode BCA. Chaque concentration a été réalisée en triplicat.

e) Electrophorèse

Un gel SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) composé du gel de concentration (4% acrylamide, Bio-rad, TGX FastCast Acrylamide solution) et du gel de migration (10% acrylamide, Bio-rad, TGX FastCast Acrylamide solution) a été coulé dans une cassette et une attente de 30min a été réalisée pour permettre leur polymérisation. Une quantité équivalente de protéines (10 à 15 µg) de chaque échantillon ainsi que 6µl de marqueur de taille (Bio-rad, #161-0374) ont été déposés sur le gel de western blot et mis à migrer pendant 1h à 200V. Le gel a été récupéré et activé par exposition aux U.V. pendant 3 min puis le transfert sur une membrane de poly-fluorure de vinylidène (PVDF, Bio-rad) a été réalisé par le système Turbo Transblot (Bio-rad). La membrane a été lavée dans une solution de blocage (TBS 1X + Tween 0,05% + lait3%) afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques pendant 30 min à température ambiante. L'incubation de l'anticorps primaire a été réalisée sur la nuit à 4°C dans une solution :

TBS 1X + Tween 0,05% + lait 3% + anticorps primaire anti Cx43 au 1/250^{ème} (anticorps de Lapin dirigé contre la partie C-terminale de la Cx43, Merck millipore, #AB1728) ou l'anticorps primaire anti-Cx45 (monoclonal de lapin dirigé contre le domaine C-terminal de Cx45 ; Alpha Diagnostic CX45-A) dilué au 1/200^{ème}. Deux lavages dans du TBS1X+Tween 0,05% pendant 10min à température ambiante ont été réalisés. L'incubation de l'anticorps secondaire a été réalisé pendant 1h30 à température ambiante dans une solution TBS 1x + Tween 0,05% + lait 3% + anticorps secondaire 1/1000^{ème} (Bio-rad, IgG de Chèvre anti-Lapin couplé à la HRP, #STAR121P). Après deux lavages TBS 1X - Tween 0,05% la révélation a été réalisée. La membrane a été placée dans un chemicon (Bio-rad) et les protéines totales ont été révélées par U.V. La membrane a ensuite été mise en présence du substrat de la HRP, le luminol (SuperSignal West Pico Substrate ou SuperSignal West Femto Substrate, Thermo Fischer Scientific) puis placée une seconde fois dans le chemicon (Figure 35). La révélation par U.V. a été réalisée et la lumière émise a été enregistrée à 425nm.

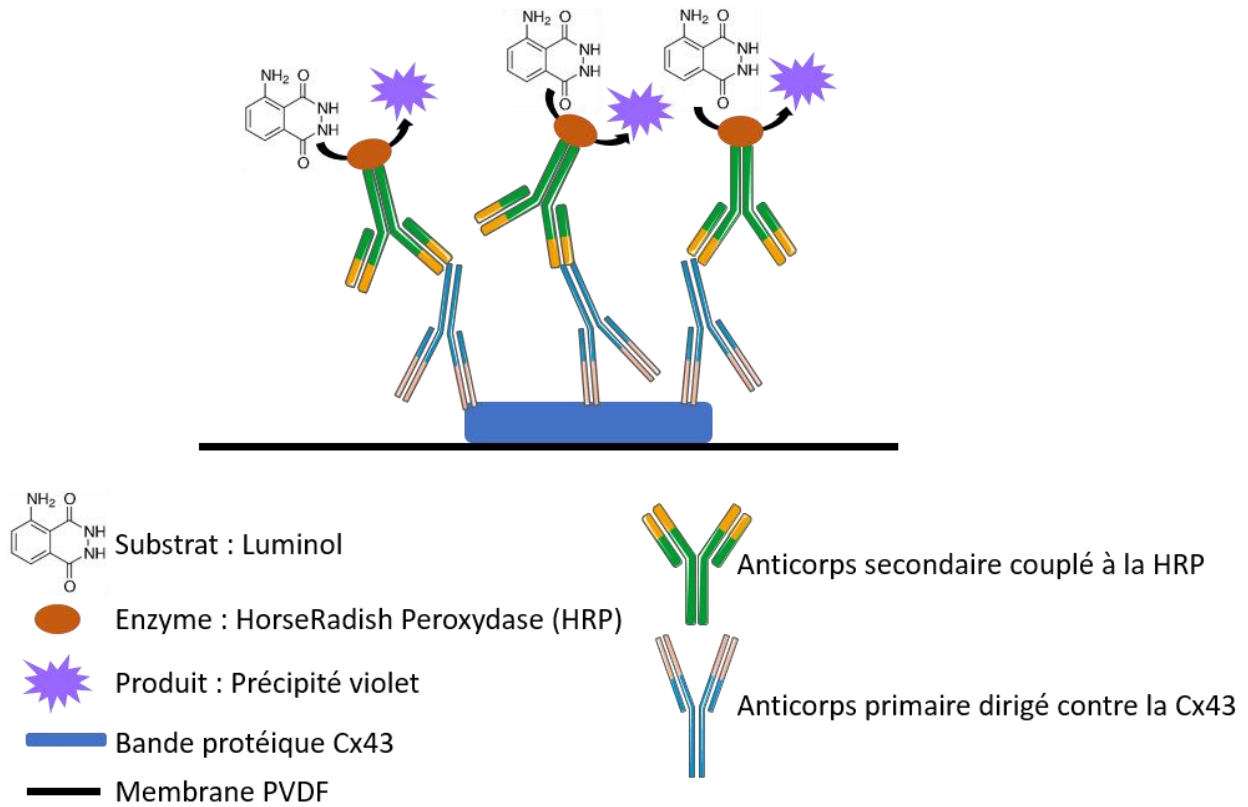


Figure 35 : Schéma de la révélation de la Cx43 par western blot. Cx43 sur la membrane PVDF est reconnue spécifiquement par les anticorps primaires anti-Cx43. Les anticorps secondaires couplés à la HRP se conjuguent aux anticorps primaires. La révélation est réalisée par ajout de luminol qui permet d'avoir un précipité violet. (Sébastien Dupuis).

La caractérisation des bandes d'intérêts a été réalisée avec le logiciel ImageJ. La quantification de l'intensité des bandes correspondantes à la Cx43, Cx45 ou de la vinculine (le marqueur de quantité de protéines) a été analysée. Les rapports Cx43/vinculine ou Cx45/vinculine ont été calculés afin d'avoir une normalisation de la quantité de Cx43 ou de la Cx45 respectivement.

III/ Enregistrements électrophysiologiques

a) Double voltage clamp

Les cellules ont été maintenues à température ambiante dans une solution Tyrode de composition (en mmol/l) : 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7.4) 5 glucose, 2 Na-pyruvate. Les pipettes de patch clamp en verre ont été étirées (étireuse DMZ, Zeitz Instruments GmbH / Lochhamer Str. 31 / 82152 Martinsried / Germany / Inh. Werner Zeitz) et remplies de solution de composition (en mmol/l) : 120 K-aspartate, 120 KOH, 10 NaCl, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 3 MgATP, 5 HEPES (pH 7.2). Par conséquent, une résistance comprise entre 3 et 6 MΩ a été mesurée. Les enregistrements ont été réalisés dans une chambre expérimentale et avec un microscope inversé (Nikon eclipse Ti-U) a été utilisé (Figure 36).

L'application de la stimulation est contrôlée par ordinateur. Le courant appliqué est initié par l'amplificateur (HeKa, EPC 10 USB Double). L'amplificateur contient le convertisseur analogique/digital (A/D) et digital/analogique (D/A) permettant la conversion des signaux analogiques en valeurs numériques. Le courant atteint les préamplificateurs (HeKa, EPC 10 USB probe) qui contiennent les convertisseurs courant/potentiel et sont directement connectés aux électrodes d'enregistrements dans les micropipettes de patch clamp. Les enregistrements des signaux se font par les mêmes voies que la stimulation dans un sens inverse.

Les deux voies permettent des stimulations et des enregistrements simultanés et indépendants.

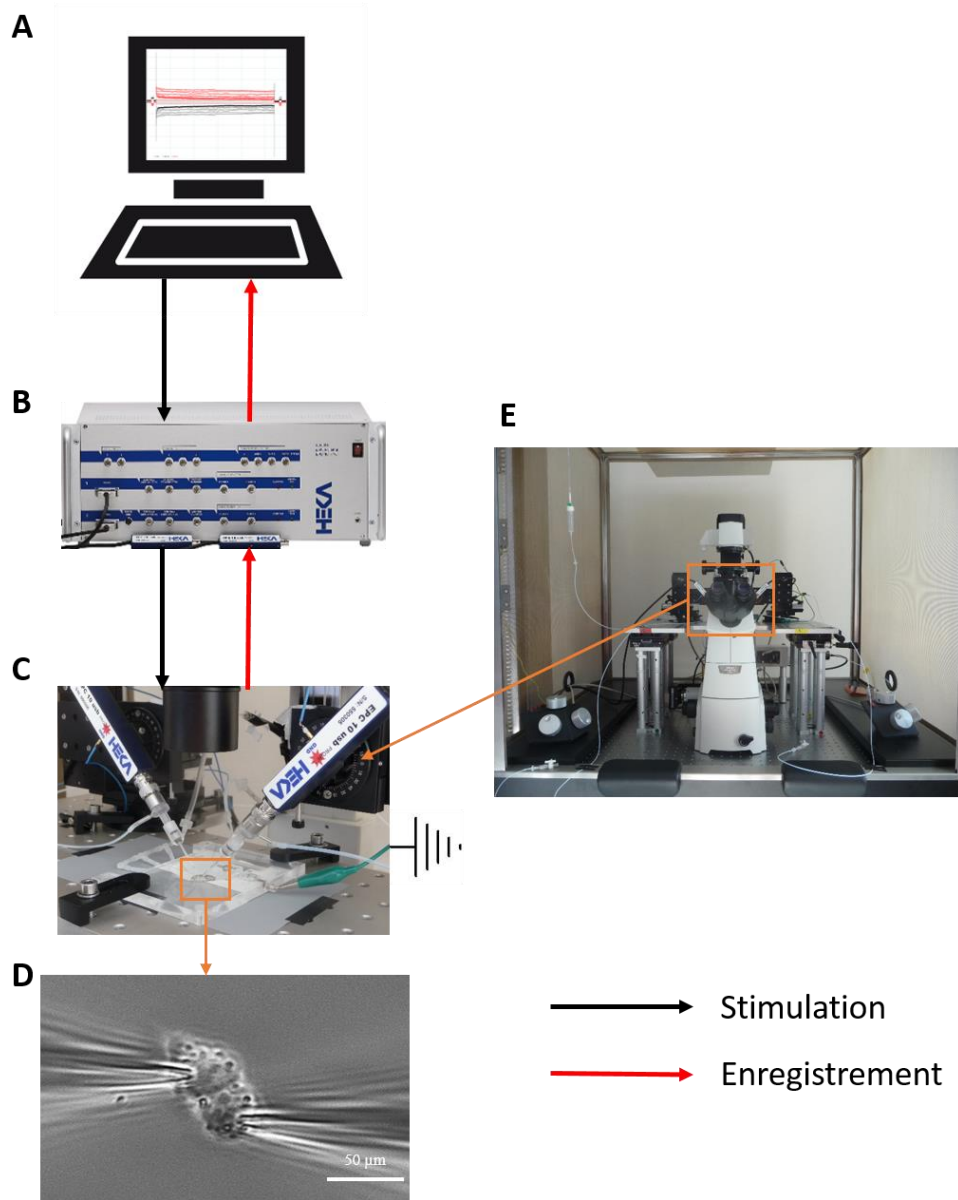


Figure 36 : Poste expérimental de travail. Les courants de jonctions sont enregistrés sur ordinateur grâce au logiciel PatchMaster (HeKa Elektronik) (A). La stimulation est contrôlée par l'amplificateur HeKa Elektronik (B) et le courant injecté dans les préamplificateurs (C) permet de maintenir les potentiels de membrane imposés puis dans chaque cellule placées dans la chambre expérimentale (C) via les pipettes en verre (D). L'opération est réalisée sous un microscope inversé (E). (Sébastien Dupuis).

Les paires de cellules ont été clampées en configuration cellule entière (figure 37) et le potentiel de membrane (V_m) a été maintenu à 0mV sur les deux cellules.

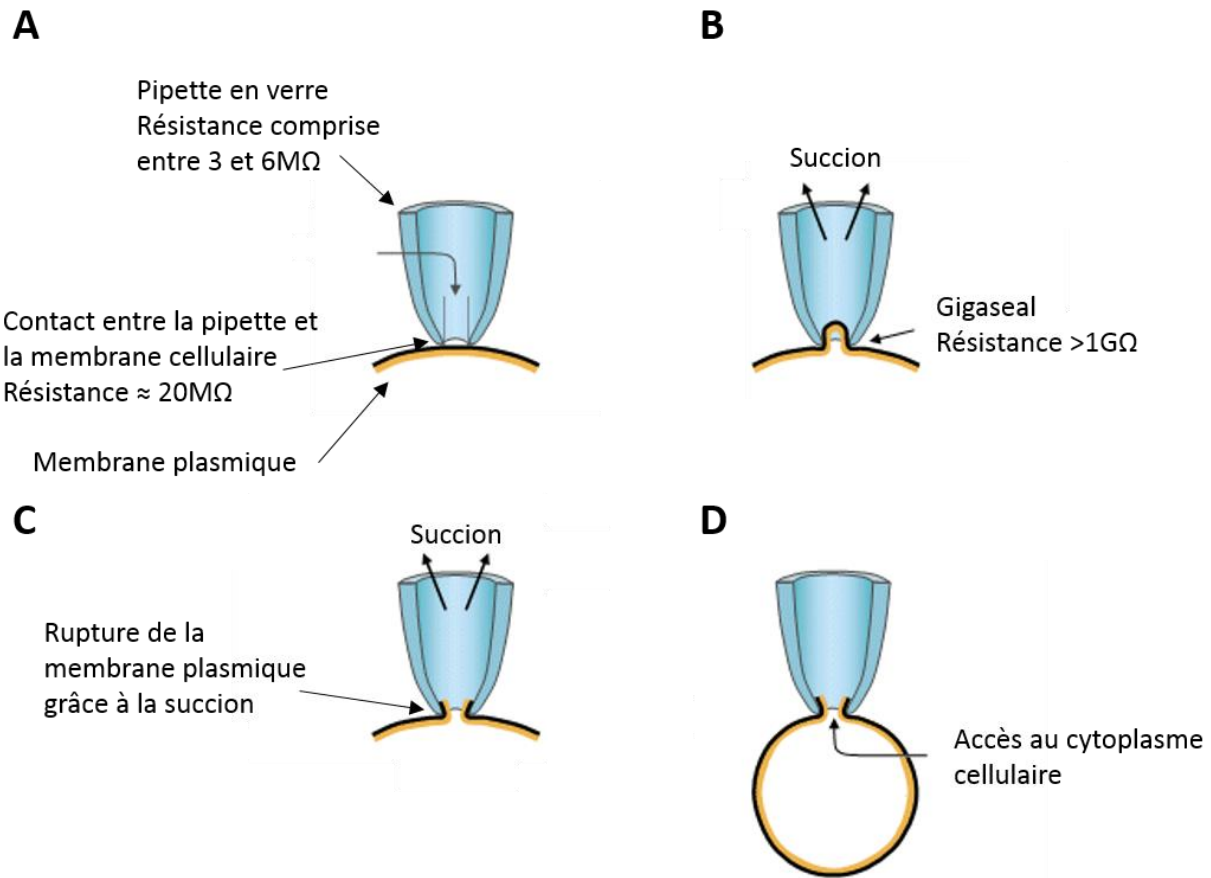


Figure 37 : Etapes de formation de la configuration cellule entière. **A** : La pipette en verre est collée à la membrane plasmique de la cellule. **B** : Une succion est réalisée pour passer en configuration cellule attachée. La résistance mesurée est supérieure au gigaohm (GΩ). **C** : Le gigaseal stabilisé, une succion est appliquée afin de rompre la membrane au contact de la pipette pour passer en configuration cellule entière. **D** : L'accès au cytoplasme cellulaire permet la dépolarisation ou l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire. (Adaptée de Hamill et al., 1981).

b) Potentiel de jonction (V_j)

Le maintien d'un $V_m=0\text{mV}$ permet l'inhibition de canaux ioniques voltages dépendants et permet de stimuler les cellules avec des hyperpolarisations ou dépolarisations d'amplitudes importantes (cf. propriétés électriques). L'une des cellules a été soit hyperpolarisée soit dépolarisée tandis que la deuxième cellule a été maintenue à $V_m = 0\text{mV}$. Le gradient de potentiel ainsi créé, appelé potentiel de jonction V_j , défini par la formule : $V_j = V_{m2} - V_{m1}$, où V_{m1} et V_{m2} sont les potentiels de membrane des cellules adjacentes 1 et 2 respectivement. Le courant de jonction (I_j) créé par V_j et passant par les jonctions gap a été enregistré sur les deux cellules et par convention, les courants analysés proviennent de la cellule non stimulé afin d'éviter les biais causés par l'activation de canaux ioniques voltage dépendant (Figure 38).

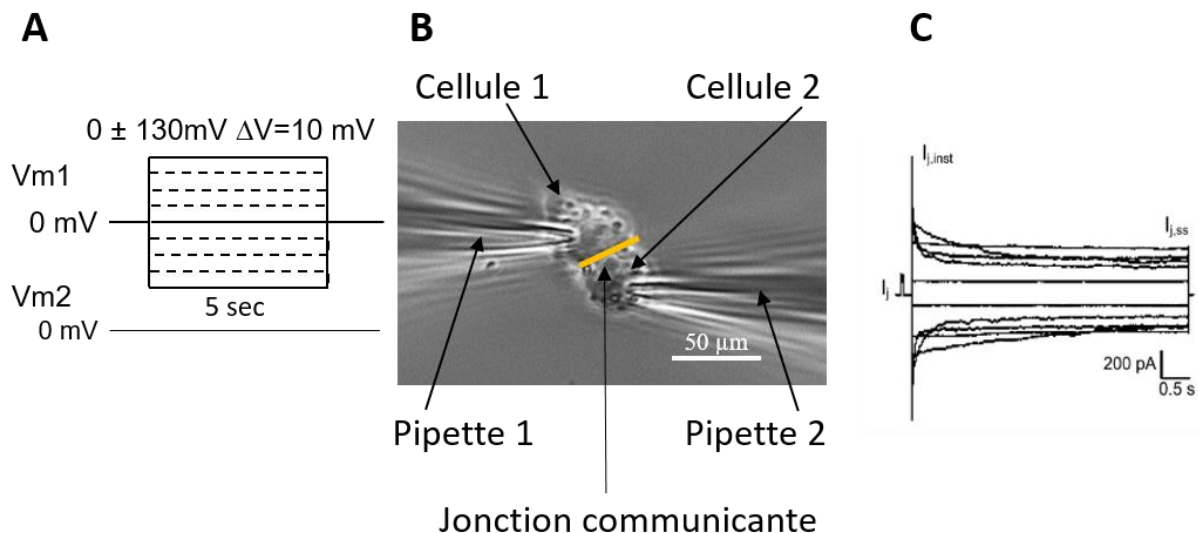


Figure 38 : Exemple de protocole de dépendance au potentiel de jonction sur une paire de cellule RLE. Dans cet exemple, la stimulation est appliquée sur la cellule 1 (A, V_{m1}) et le V_m de la cellule 2 est maintenue à 0mV (A, V_{m2}). La paire de cellule est reliée par les jonctions communicantes (B). Les courants de jonction sont enregistrés sur les deux cellules (C).

IV/ Propriétés électriques

a) Couplage électrique intercellulaire $G_{j,0}$

Le couplage électrique intercellulaire a été étudié en appliquant une stimulation dépolarisante de $V_j = -10\text{mV}$ pendant 500ms sur l'une des deux cellules (Figure 39). A 10mV, la désactivation des canaux de jonction est considérée nulle (cf. introduction).

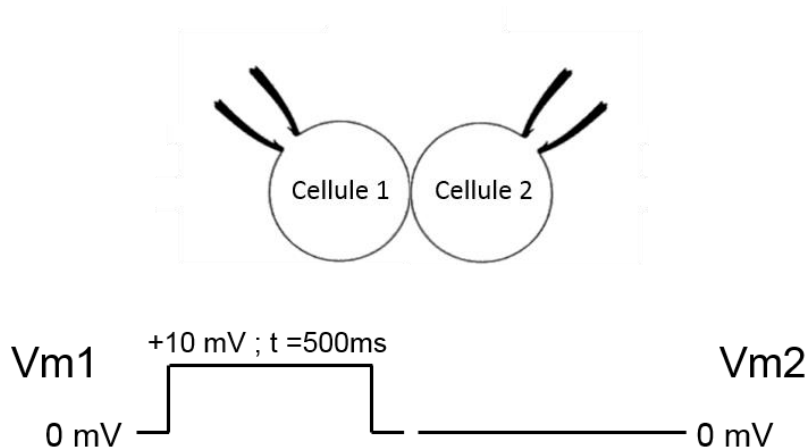


Figure 39 : Protocole de stimulation du couplage électrique intercellulaire.

Le I_j enregistré a été mesuré et la conductance de jonction ($G_{j,0}$) respective calculée par la formule : $G_{j,0} = I_j / V_j$. Une correction prenant en compte les résistances en série a été appliquée et est appelée $g_{j0,c}$ (Veenstra, 2001). $g_{j0,c}$ a été calculée par la formule :

$$g_{j0,c} = G_{j,0} / [1 - g_j * (R_{s1} + R_{s2})]$$

où R_{s1} et R_{s2} sont les résistances en série mesurées sur les cellules 1 et 2 respectivement.

b) Dépendance au V_j

Une des cellules a été soit dépolarisée soit hyperpolarisée ($V_j=0\pm 130\text{mV}$, $\Delta V=10\text{mV}$, 5s, Figure 40) et le courant de jonction a été mesuré au début de la stimulation, c'est le courant de l'état instantané $I_{j,\text{inst}}$, et en fin de stimulation où le courant est considéré stable $I_{j,\text{ss}}$. Les conductances respectives ont été calculées par la formule $g_j=I_j/V_j$ et le rapport $g_{j,\text{ss}}/g_{j,\text{inst}}$ reporté en fonction de V_j . Une courbe de tendance suivant l'équation de Boltzmann a été appliquée. Les paramètres de dépendance au potentiel (V_{j0} : potentiel V_j de demi-inactivation maximale, $g_{j,\text{min}}$: conductance minimale observée pour des V_j de haute amplitude et z : nombre de charge positive passant par les canaux de jonctions à l'état stable) ont été caractérisés.

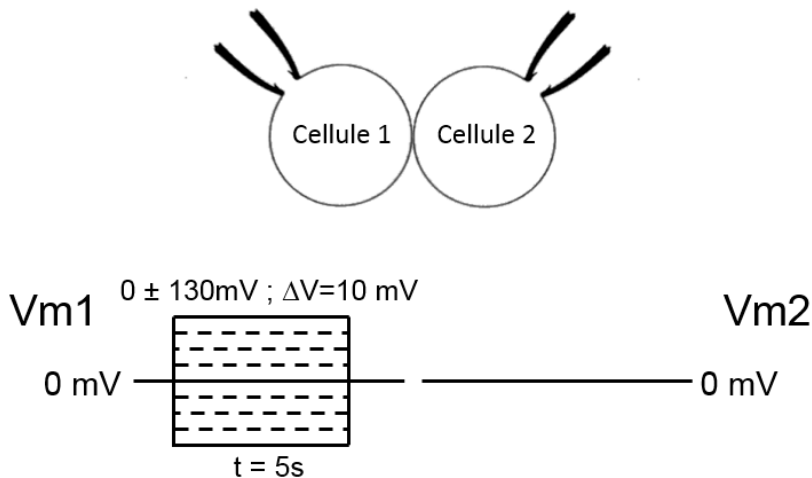


Figure 40 : Protocole de dépendance au V_j . La cellule 1 est dépolarisée ou hyperpolarisée par une stimulation de $V_{m1}= 0 \pm 130\text{mV}$ pendant 5s et la cellule 2 est maintenue à $V_{m2}=0\text{mV}$.

c) Cinétiques de désactivation

La désactivation de I_j a été caractérisée par une régression mono-exponentielle pour $V_j \leq 100\text{mV}$ ou bi-exponentielle pour $V_j \geq 100\text{mV}$ représentée par des constantes de temps rapide, $\tau_{d,1}$, et lente, $\tau_{d,2}$. $\tau_{d,1}$ a été reportée en fonction de V_j et une régression mono-exponentielle a été

réalisée afin de caractériser les paramètres de désactivation $\tau_{d,0}$: valeur de $\tau_{d,1}$ extrapolée à $V_j=0\text{mV}$ et V_τ : constante de désactivation.

d) Cinétiques de restitution

Le délai de restitution a été étudié par un protocole précis divisé en deux séquences (Figure 41). La séquence P1 où une stimulation de 5s d'amplitude $\pm 10, \pm 60, \pm 120\text{mV}$ a été appliquée afin d'avoir différents niveaux de désactivation : 10mV, pas désactivation, 60mV, désactivation partielle et 120mV, désactivation maximale. La séquence P2 a été organisée en plusieurs stimulations brèves (2ms) consécutives de même amplitude que P1 séparées par un intervalle de temps croissant de 5ms à 3s. Les I_j enregistrés pendant P1 ont été mesurés en début en fin de stimulation. La mesure de début de stimulation représente la valeur de référence et la mesure en fin de stimulation représente le début de la restitution ($t=0\text{s}$). Les I_j de P2 ont été mesurés et les rapports g_{P2}/g_{P1} ont été calculés et reportés en fonction du temps total après P1.

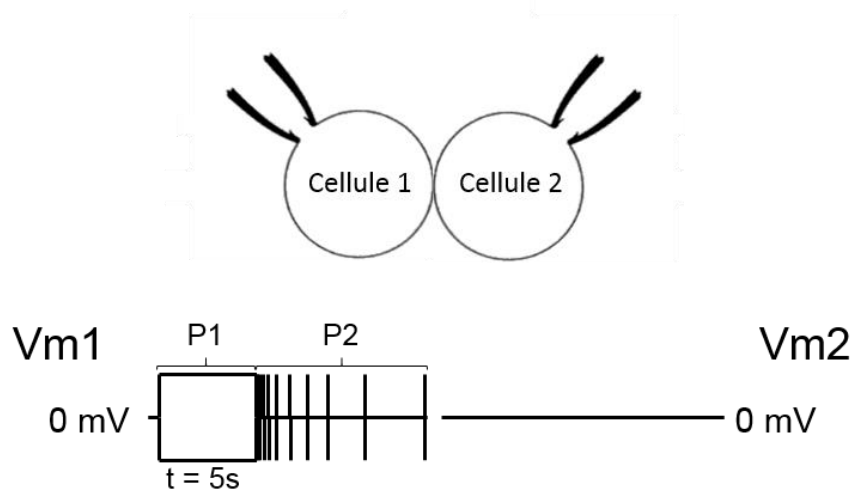


Figure 41 : Protocole de restitution.

e) Conductances unitaires

L'heptanol, un découpleur non spécifique permettant le découplage électrique intercellulaire a été utilisé à une concentration de 2,5mM. Un protocole bipolaire de $\pm 30\text{mV}$ à $\pm 110\text{mV}$ par incrément de $\pm 20\text{mV}$ a été appliqué pendant 500ms pour chaque polarité (Figure 42). Les événements unitaires ont été enregistrés après un retour progressif du couplage électrique. Le courant unitaire de jonction (i_j) a été enregistré pour chaque événement et les conductances unitaires calculées et reportées en histogramme de fréquence de distribution.

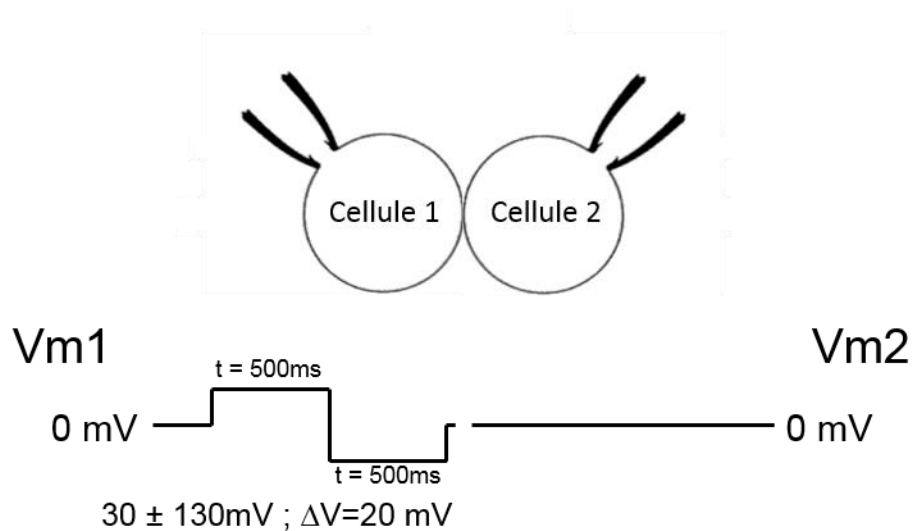


Figure 42 : Protocole de conductances unitaires.

V/ Simulation de la dépendance au V_j

Un modèle théorique de dépendance au V_j a été réalisé pour comparer les résultats obtenus expérimentalement pour les différents ratios de co-expression dans l'hypothèse d'une formation de canaux de jonctions homomériques-homotypiques Cx43 et Cx45 dans des proportions similaires aux conditions expérimentales (Grikscheit et al., 2008a). Les courbes de références $g_j=f(V_j)$ pour des canaux de jonction homomériques-homotypiques Cx43 (cf : résultats) et Cx45 (Desplantez et al., 2004) ont été utilisés comme référence pour établir les simulations par la formule:

$$g_j=f(V_j)=[p(g_j=f(V_j))Cx43]+[q(g_j=f(V_j))Cx45]$$

où $g_j=f(V_j)Cx43$ et $g_j=f(V_j)Cx45$ représentent les courbes de références de la Cx43 et de la Cx45 respectivement, p et q représentent le pourcentage pour chaque courbe de référence : $p/q=85,3\%/14,7\%$; $69,7\%/30,3\%$ et $50\%/50\%$ pour Cx43:Cx45=5.8, 2.3 et 1 respectivement.

VI/ Acquisition des données et analyses

Les données ont été stockées sur ordinateur pour analyses. Les enregistrements ont été passés par un filtre de Bessel (1kHz) et digitalisées (3.33kHz). L'acquisition des signaux (fréquence d'acquisition à 20kHz) a été réalisée par le logiciel Patchmaster. Les analyses de données ont été réalisées avec le logiciel Fitmaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, 67466, Germany), les courbes et les statistiques ont été réalisées avec les logiciels SigmaPlot, (Systat Software Inc, San Jose, 95110, USA) et GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, 92037, USA). Les données ont été présentées en moyenne \pm SEM.

Résultats

I/ Caractérisations biochimiques

a) Westerns blots

i. Caractérisations précédentes

Les ratios Cx43:Cx45 ont été caractérisés par western blot et immunofluorescence (Desplantez et al., 2015; Grikscheit et al., 2008). Les trois concentrations de ponastérone A utilisées permettent le contrôle du niveau d'expression de la Cx45 (cf : matériel et méthodes) : plus la concentration est élevée, plus le niveau d'expression de la Cx45 est important, jusqu'à un niveau d'expression maximal pour une induction avec 2 μ M de ponastérone A.

De plus, le niveau d'expression de Cx43 n'est pas modifié de manière significative par l'expression de la Cx45 (Figure 43, Tableau 3, (Desplantez et al., 2015; Grikscheit et al., 2008)).

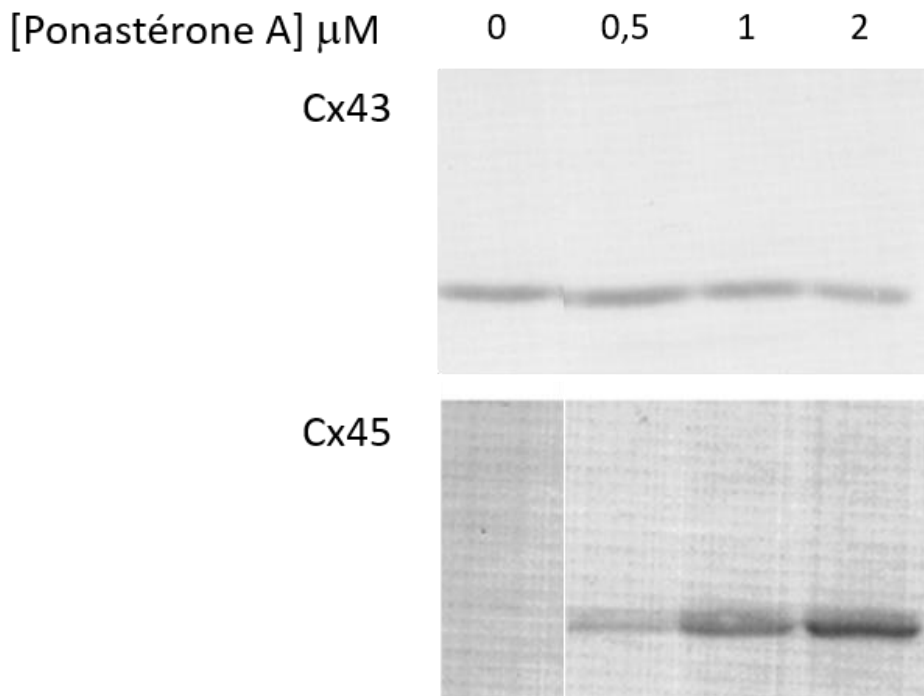


Figure 43 : Westerns blots de Cx43 (haut) et Cx45 (bas) en fonction de la concentration en ponastérone A. (Adaptée de Grikscheit K et al 2008).

Les westerns blots ont permis d'estimer les niveaux d'expressions de Cx43 et Cx45 et les ratios de Cx43:Cx45 (Grikscheit et al., 2008). Ainsi, pour des concentrations en ponastérone A de : 0,5 ; 1 et 2 μ M, des ratios jonctionnels Cx43:Cx45 respectifs : 5.8, 2.3 et 1 sont calculés.

		Ponastérone A (μ M)			
		0	0,5	1	2
Cx43 (u.a.)	Non-jonctionnel	44,9 \pm 2,5	43,7 \pm 5,5	43,6 \pm 0,6	39,6 \pm 4,7
	Jonctionnel	55,1 \pm 3,4	78,3 \pm 11,9	76,8 \pm 0,6	61,1 \pm 4,6
Cx45 (u.a.)	Non-jonctionnel	ND	41,6 \pm 10,8	80,4 \pm 23,5	94,4 \pm 26,1
	Jonctionnel	ND	13,3 \pm 2,2	33,5 \pm 10,5	46,1 \pm 12,0
Ratios Cx43:Cx45	Non-jonctionnel	/	1	0,5	0,4
	Jonctionnel	/	5,8	2,3	1,3

Tableau 3 : Estimations de la quantité relative de Cx43 et de Cx45 avec et sans ponastérone A. Les valeurs sont normalisées en fonction de l'expression totale de Cx43 dans les cellules non induites, et présentées en moyenne \pm SEM ; ND : non détectable. Source : (Grikscheit et al., 2008).

ii. Caractérisations de notre étude

De façon similaire à l'étude précédente (Grikscheit et al., 2008) il nous a fallu contrôler dans nos conditions l'expression de la Cx43 et de la Cx45 par une caractérisation biochimique (westerns blots et immunofluorescence).

1. Expression de la Cx43

Nous avons observé que le niveau d'expression de la Cx43 est augmenté de manière non significative avec l'expression de la Cx45 pour une induction faible et intermédiaire, et diminué

pour une induction maximale (Figure 44). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Desplantez et al., 2015.

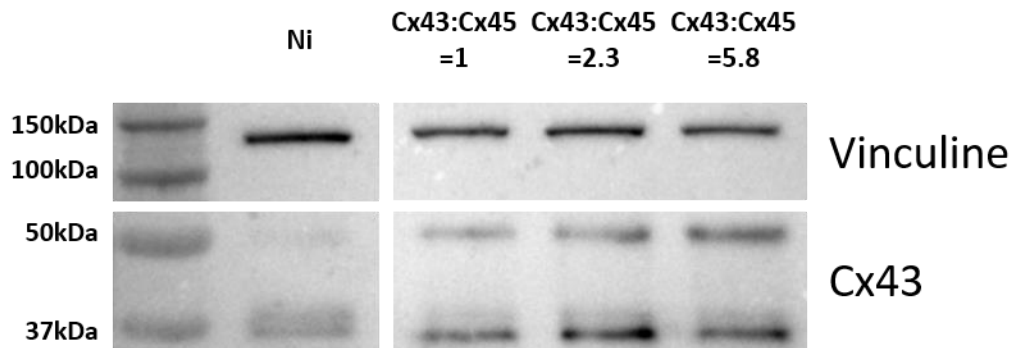


Figure 44 : Western blot d'expression de Cx43 dans les différentes conditions d'induction de Cx45. La vinculine est utilisée comme marqueur de charge. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

2. Expression de la Cx45

La condition Ni ne montre pas de bande caractéristique de la Cx45 qui indique une absence d'expression de Cx45 (Figure 45) ou un niveau d'expression trop faible pour être détectée (McCain et al., 2012). De plus, nous avons observé l'expression de Cx45 dans les conditions induites en fonction de la concentration en ponastérone A : plus la concentration en ponastérone A est élevée, plus l'intensité de la Cx45 est importante (Figure 45). Les ratios Cx45/Vinculine sont de 0 pour la condition Ni, $0,5 \pm 0,1$ pour Cx43:Cx45=5.8, $0,8 \pm 0,2$ pour Cx43:Cx45=2.3 et $1,6 \pm 0,6$ pour Cx43:Cx45=1. Le niveau d'expression total de la Cx45 est donc doublé pour la condition Cx43:Cx45=2.3 et triplé pour la condition Cx43:Cx45=1 par rapport à la condition Cx43:Cx45=5.8 correspondant à l'étude de Desplantez et al 2015.

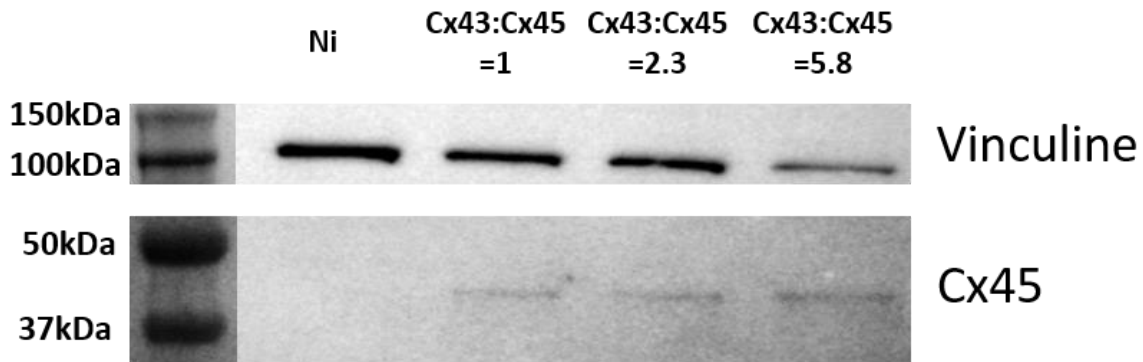


Figure 45 : Western blot pour la quantification de la Cx45. La vinculine est utilisée comme marqueur de charge. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

3. Expression de la Cx43 avec ARNi anti-Cx43

Les westerns blots sont réalisés pour vérifier l’expression de la Cx43 et sa diminution en présence d’ARNi anti-Cx43. Comme attendu, nous observons une diminution de l’expression après transfection par l’ARNi anti-Cx43 dans les conditions Ni et Cx43:Cx45=1 (Figure 46). Cette dernière est la condition d’induction utilisée pour étudier l’effet d’une diminution d’expression de Cx43. Nous nous sommes intéressés aux jours 1 (J1) et 2 (J2) après transfection qui correspondent au

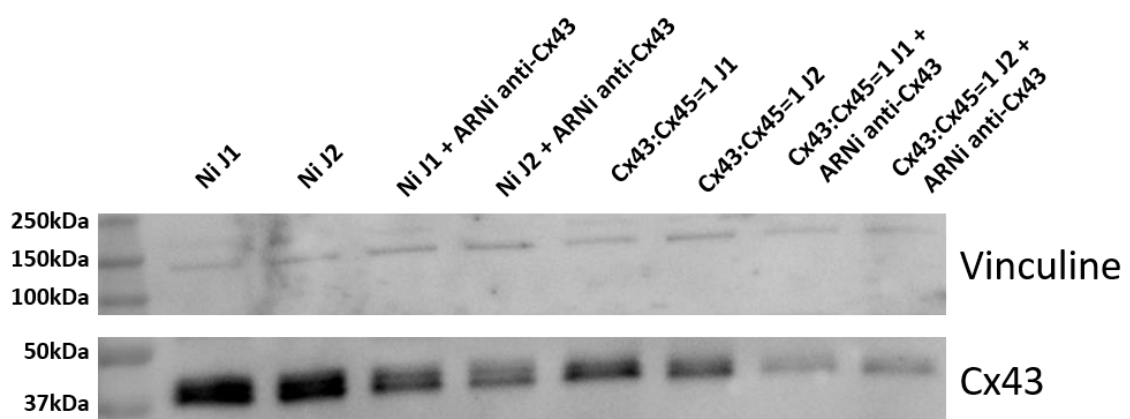


Figure 46 : Western blot pour la Cx43 dans les conditions Ni et Cx43:Cx45=1 en présence ou en absence d’ARNi anti-Cx43 aux jours 1 et 2 après transfection. La vinculine est utilisée comme marqueur de charge. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

moment où l’ARNi anti-Cx43 est le plus efficace. Aux jours 3 et 4, une ré-augmentation de

l'expression de Cx43 est observée due à une perte d'efficacité de l'ARNi anti-Cx43 expliqué par une dilution de l'ARNi anti-Cx43 avec la multiplication cellulaire.

4. Expression de la Cx45 avec ARNi anti-Cx43

Les westerns blot réalisés pour contrôler l'expression de la Cx45 en présence ou en absence d'ARNi anti-Cx43 montrent une absence de Cx45 dans la condition Ni comme attendu et un niveau d'expression homogène dans la condition Cx43:Cx45=1 avec ou sans ARNi anti-Cx43 (Figure 47).

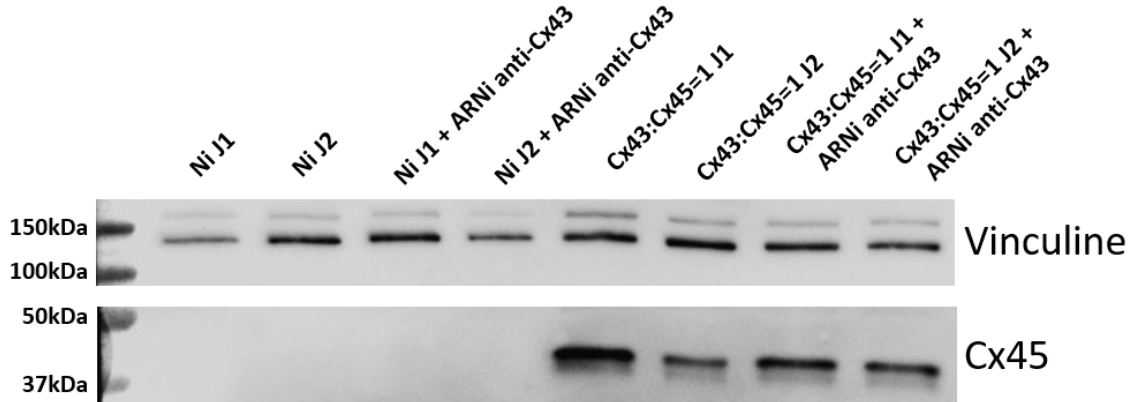


Figure 47 : Western blot pour la Cx45 dans les cellules Ni et Cx43:Cx45=1 aux jours 1 et 2 après transfection en présence et en absence d'ARNi anti-Cx43. La vinculine est utilisée comme marqueur de charge. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

b) Immunofluorescence

i. Localisation cellulaire de Cx43 et Cx45

Comme attendu, nous n'avons pas observé de marquage spécifique de Cx45 dans les cellules Ni malgré un marquage diffus dans le cytoplasme (Figure 48). De plus et comme attendu dans les

cellules Ni, la Cx43 est localisée au niveau des membranes plasmiques et dans le cytoplasme (Figure 48).

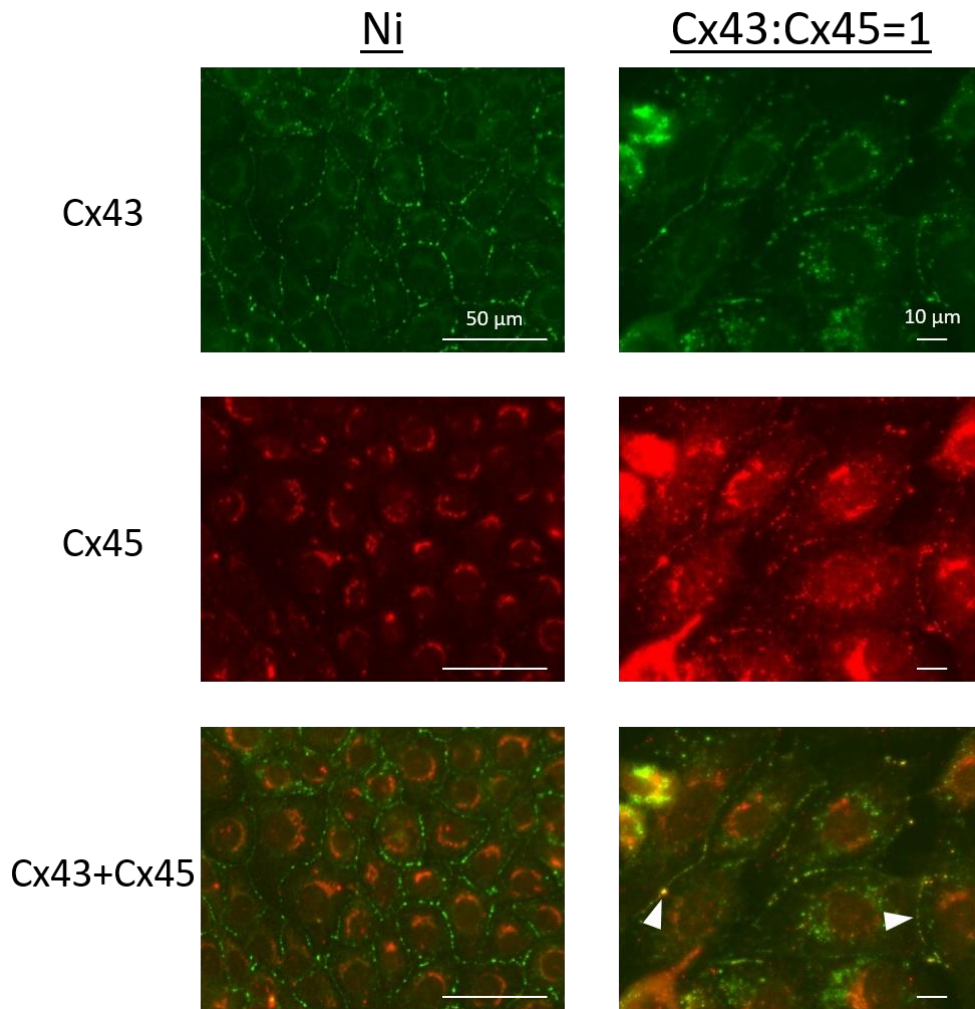


Figure 48 : Immunofluorescence de Cx43 (vert) et de Cx45 (rouge). Gauche : cellules Ni. Droite : cellules Cx43:Cx45=1. Les flèches blanches illustrent la co-localisation à la membrane de Cx43 et Cx45. grossissement Ni : x200 et Cx43:Cx45=1 : x400. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

Après induction de l'expression de la Cx45 (Cx43:Cx45=1), la Cx43 et Cx45 sont observées au niveau des membranes plasmiques, qui reflètent une co-localisation (Figure 48).

ii. Distribution de Cx43 avec ARNi anti-Cx43

1. Cellules Ni

En condition contrôle nous observons dans les cellules Ni contrôle aux jours 1 et 2 après transfection une localisation de la Cx43 au niveau des membranes cellulaires principalement. Suite à la transfection avec l'ARNi anti-Cx43 la localisation de la Cx43 reste principalement au

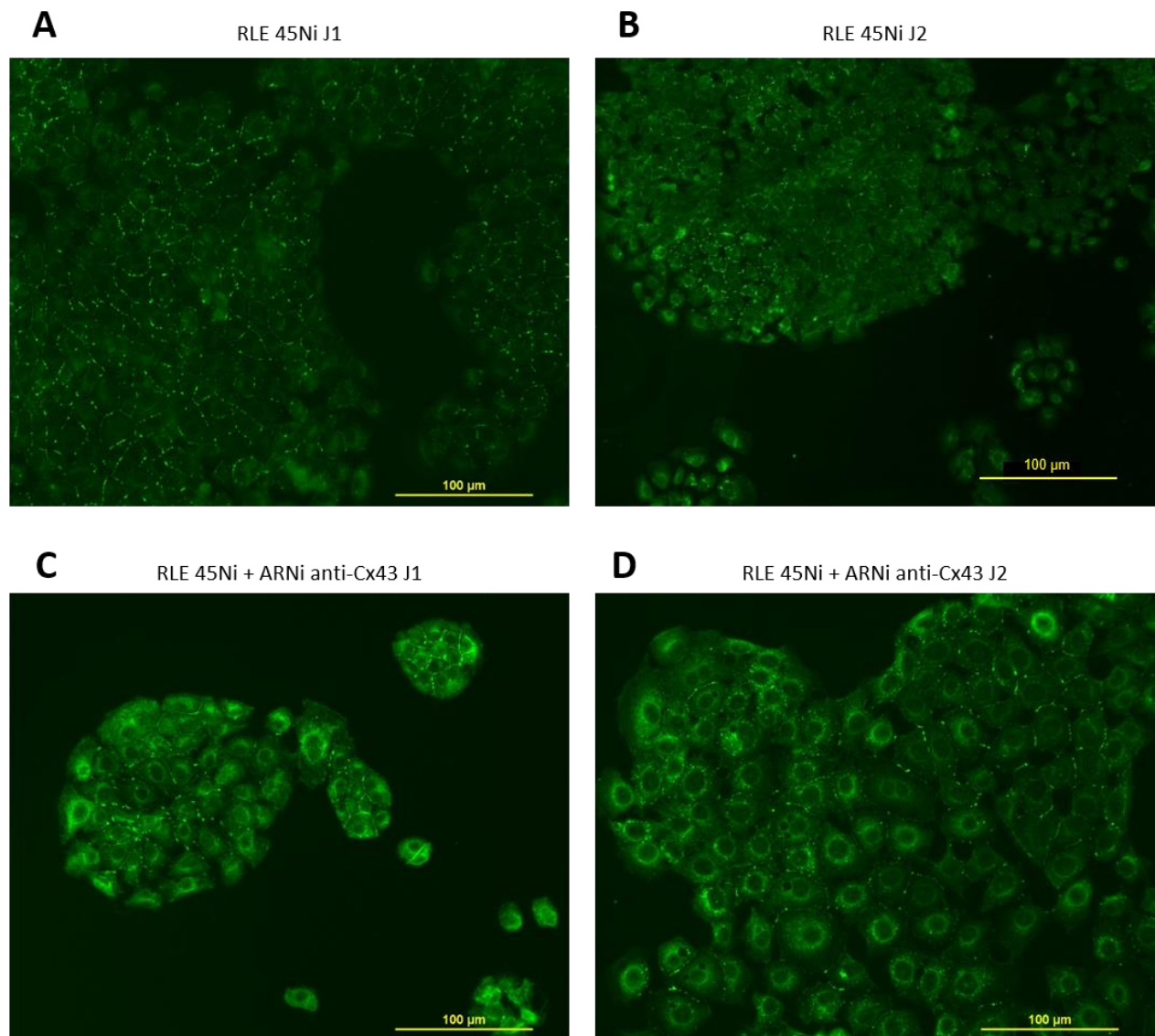


Figure 49 : Immunofluorescences de Cx43 (vert) sur des cellules non induites contrôle au jour 1 (A) et 2 (B) et sur des cellules non induites transfectées par ARNi anti-Cx43 au jour 1 (C) et 2 (D) après transfection. Grossissement x200. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

niveau des membranes cellulaires mais à plus faible intensité de fluorescence indiquant une diminution de l'expression significatif par rapport à la condition non transfectée (Figure 49).

2. Cellules Cx43:Cx45=1

Dans les cellules induites pour un ratio de Cx43:Cx45=1, Cx43 est principalement localisé au niveau des membranes plasmiques à une intensité de fluorescence qui semble plus faible que

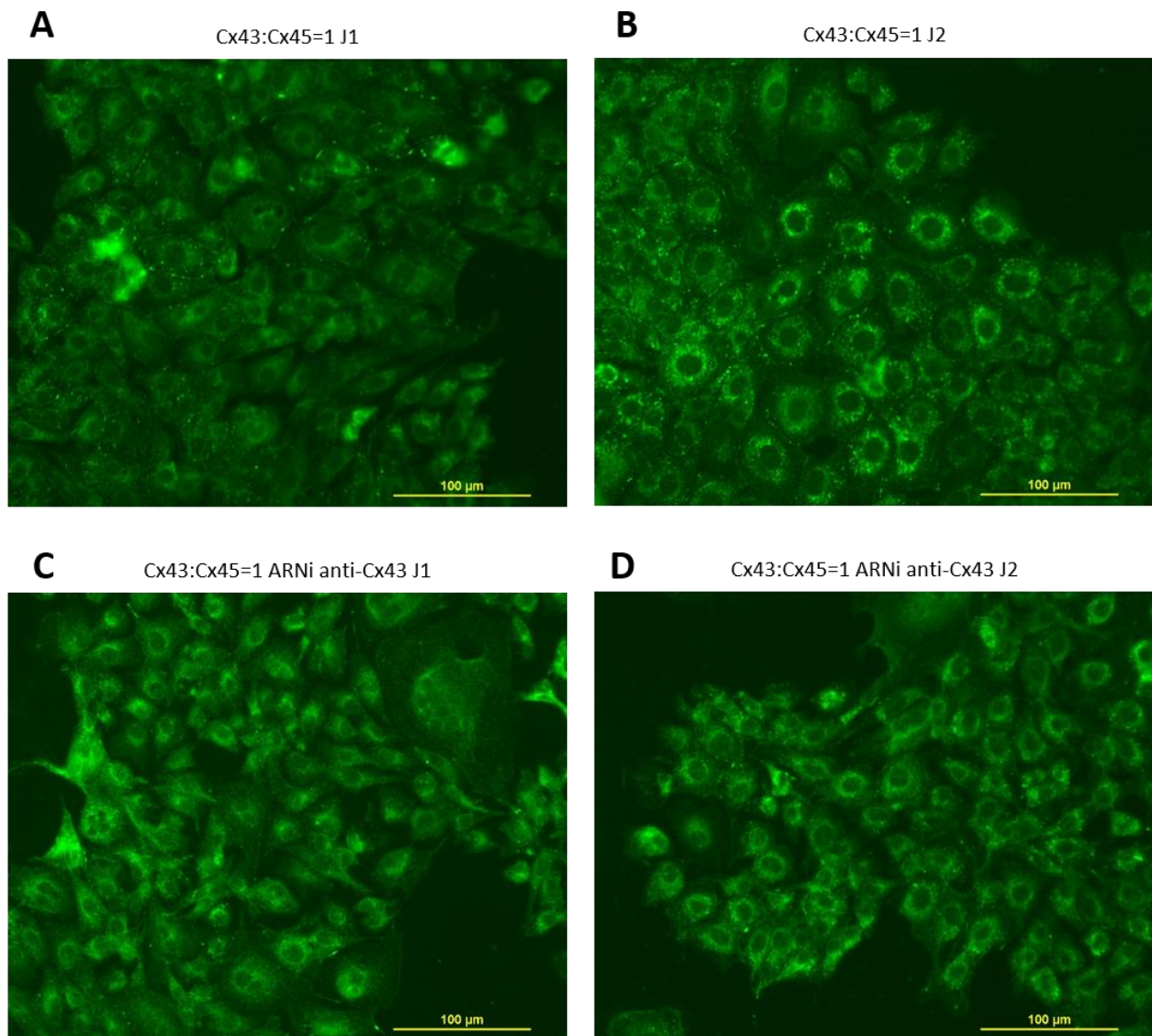


Figure 50 : Immunofluorescences de Cx43 (vert) sur des cellules Cx43:Cx45=1 au jour 1 (A) et 2 (B) et sur des cellules Cx43:Cx45=1 transfectées par ARNi anti-Cx43 au jour 1 (C) et 2 (D) après transfection. Grossissement x200. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

dans les cellules Ni (Figure 50 A et B). Aucun marquage Cx43 n'est observé après transfection de l'ARNi anti-Cx43 suggérant une efficacité de l'ARNi anti-Cx43 et une expression de Cx43 inférieure aux limites de détections (Figure 50 C et D, (McCain et al., 2012)).

II/ Propriétés électriques des canaux de jonction

a) Paires de cellules homologues : ratio Cx43:Cx45 identique

L'étude des propriétés électriques des canaux de jonction est essentielle dans la compréhension de la propagation du potentiel d'action cardiaque. Quatre connexines sont co-exprimées dans le cœur : Cx40, Cx43, Cx45 et Cx30.2 selon des profils spécifiques. Les profils de co-expressions des connexines déterminent la formation de canaux de jonction spécifiques aux propriétés électriques distinctes. Les propriétés électriques des canaux de jonctions (couplage électrique, dépendance au potentiel de jonction, conductances unitaires) sont considérées comme étant des facteurs clés dans la régulation de la propagation du potentiel d'action. Les études précédentes ont permis d'identifier des contributions relatives des connexines dans la formation des canaux de jonctions de canaux de jonction différents en utilisant des modèles cellulaires (Desplantez et al., 2007, 2004). Ces études ont été corrélées à des observations de culture primaire de myocytes auriculaires et ventriculaires où les canaux hétéromériques sont retrouvés en majorité dans le couplage électrique (Beauchamp, 2004; Beauchamp et al., 2012; T. Desplantez et al., 2012).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la formation et aux propriétés électriques des canaux de jonction dans des paires de cellules exprimant les mêmes ratios.

Cette étude a permis la rédaction et la soumission d'un article intitulé :

« Influence du ratio de co-expression Cx43:Cx45 sur la formation des canaux de jonctions et leurs propriétés électriques »

Dupuis S, Constantin M, Chaigne S et Desplantez T.

RESUME DE L'ETUDE :

Les cellules épithéliales de foie de rat (RLE) exprimant la Cx43 de manière endogène ont été utilisées. Ces cellules ont été préalablement transfectées de manière stable par le système ecdysone afin d'exprimer la Cx45, dont le niveau d'expression est dépendant de la concentration en inducteur (la ponastérone A). Les enregistrements électriques sur paires de cellules ont été réalisés par la technique du double voltage clamp afin de caractériser les propriétés électriques macroscopiques et unitaires des canaux de jonctions. Une condition contrôle sans expression de Cx45 (Ni) et trois ratios de co-expression Cx43:Cx45 (5.8, 2.3 et 1) ont été étudiés.

Dans un premier temps, nous avons observé dans la condition Ni des propriétés électriques macroscopiques et unitaires correspondantes aux propriétés de canaux homotypiques Cx43 (Desplantez et al., 2011, 2007, 2004). Ceci suggère l'absence d'expression de la Cx45 sans induction.

Après induction, la co-expression de Cx43 et Cx45 nous avons observé une diminution du couplage électrique pour toutes les conditions de co-expressions indépendamment du ratio de co-expression. De plus, une augmentation de la dépendance au potentiel de jonction similaire pour toutes les conditions de co-expressions et indépendante du ratio a été observée. Les cinétiques de désactivations montrent que plus l'amplitude du potentiel de jonction est importante, plus les cinétiques sont rapides. De plus, plus le niveau d'expression de la Cx45 est augmenté, plus les cinétiques de désactivations sont ralenties. De manière similaire aux cinétiques de désactivation, les cinétiques de restitutions montrent une dépendance à l'amplitude du potentiel de jonction : plus l'amplitude du potentiel de jonction est importante, plus les cinétiques de restitutions sont rapides. L'étude des propriétés unitaires montre la formation de canaux de jonction composés de Cx43 et de Cx45 dans tous les ratios. De plus, les

canaux de jonctions sont en majorité composés de deux demi-canaux hétéromériques de même composition.

Cette étude montre l'influence de la co-expression des Cx43 et Cx45 dans la régulation de la formation des canaux de jonction caractérisés par des propriétés électriques distincts et des contributions différentes des connexines dans la formation de ces canaux de jonctions. Les propriétés électriques observées suggèrent une implication dans la régulation de la propagation du potentiel d'action. En effet, la diminution du couplage électrique, l'augmentation de la dépendance au potentiel de jonction et la diminution des conductances unitaires pourrait entraîner un ralentissement de la propagation du potentiel d'action.

ELECTRICAL PROPERTIES OF GAP JUNCTION CHANNELS: DEPENDENCE ON THE RATIO OF CO-EXPRESSED CONNEXINS Cx43 AND Cx45

Dupuis S^{1,2,3}, Constantin M^{1,2,3}, Chaigne S^{1,2,3,4}, Desplantez T^{1,2,3}

¹ IHU Liryc, Electrophysiology and Heart Modeling Institute, fondation Bordeaux Université, F-33600 Pessac- Bordeaux, France

² Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France

³ INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France

⁴ Bordeaux University Hospital (CHU), Electrophysiology and Ablation Unit, F-33600 Pessac, France

Corresponding author

Thomas Desplantez Ph.D.

IHU LIRYC

Avenue Haut Leveque

33600 Pessac

France

Email : thomas.desplantez@ihu-liryc.fr

tel : +33 (0)5 35 38 19 20

Short title: Electrical properties of Cx43:Cx45 ratios

ABSTRACT

Cardiac connexins compose gap junction channels and display different patterns of expression and ratios in the healthy and diseased conditions. While the former has been well investigated the latter is still poorly understood. This study further explores how ratios of co-expressed connexins regulate the formation and the electrical properties of gap junction channels. Three accurate ratios of Cx43:Cx45 were induced in Rat Liver Epithelial cells and used to perform dual voltage clamp recordings on cell pairs. Compared to a single expression of Cx43 the induction of Cx45 decreased the electrical coupling and increased the junctional voltage sensitivity similarly at each ratio of Cx43:Cx45. However, the higher the junctional potential V_j , the faster the deactivation, while the lower the ratio of Cx43:Cx45, the slower the deactivation. Moreover, the higher the V_j , the faster the recovery. Single channel recordings indicate the contribution of a dominant population of gap junction channels of mixed Cx43/Cx45 composition at each ratio. Our findings suggest a specific contribution of each connexin and ratio in the formation and the specific electrical properties of gap junction channels. This denotes a determinant function in regulating the impulse propagation in the healthy heart and a pro-arrhythmic dysfunction caused by a connexin remodeling.

Keywords: Connexin43. Connexin45, gap junction channels, heteromeric channels, electrical properties

INTRODUCTION

Gap junctions are specialized structures that ensure a direct intercellular biochemical and electrical communication. In the cardiac system gap junction contribute to the regulation of the propagation of the cardiac impulse from the sinus node to the ventricular myocytes that ensures the coordination of the atrial and ventricular contractions. Gap junctions are clusters of gap junction channels made of docked hexameric hemichannels constituted of proteins connexins. Four connexins are co-expressed in the different cardiac tissues (myocytes, conduction system), connexin 40 (Cx40), Cx43, Cx45 and Cx30.2, which renders possible the formation of hemichannels and gap junction channels of diverse connexins composition and organization (Desplantez et al., 2004). For example ventricular myocytes co-express mainly Cx43 and traces of Cx45, and atrial myocytes co-express large amount of Cx43 and Cx40 and traces of Cx45 (Bao et al., 2011; Severs et al., 2008). Connexins have specific patterns of expression and changing levels of expression with age (Bonda et al., 2015; Rossi et al., 2008), development (Coppin et al., 2003, 2001; Vozzi et al., 1999). Interestingly the levels of expression and the cellular localization of connexins are also modified in pathological situations such as ischemia and arrhythmias, termed as connexins remodeling (Bruce et al., 2008; Dupont et al., 2001; Gutstein et al., 2001; Paul et al., 2013).

The electrical properties of the gap junction channels, *i.e.* the junctional coupling, the voltage dependence and the unitary conductances, are considered as a key factor for regulating the cardiac impulse propagation. So far a lot of studies have demonstrated the formation of various types of gap junction channels characterized by diverse but distinct electrical properties by using cell models (Desplantez et al., 2007, 2004). Importantly these findings have been correlated to similar observations in primary atrial and ventricular myocytes where heteromeric gap junction channels, *i.e.* of mixed connexin composition, characterized by specific electrical properties govern the electrical coupling (Beauchamp, 2004; Beauchamp et al., 2012; Thomas Desplantez et al., 2012).

To date, further understand the function of the distinct pattern of expression of connexins is essential to elucidate the pro-pathological (pro-arrhythmic) connexin remodeling. More precisely, the pattern of each connexin leads to diverse ratios of 2 and 3 co-expressed connexins that suggests a determinant contribution in regulating the electrical and chemical coupling and heart function. For this purpose we aimed to investigate the gap junction channels make-up and electrical properties in function of accurate ratios of co-expressed Cx43 and Cx45. Rat Liver Epithelial cells (RLE) that express endogenous Cx43 have been stably transfected to co-express Cx45 (see material and methods). Our electrical recordings on cell pairs reveal distinct electrical properties of gap junction channels before and after distinct levels of induced expression of Cx45 both at the macroscopic and unitary levels. This reveals a fine regulation of the formation of gap junction channels in term of connexins composition and specific contribution of each type of connexins in regulating the properties of gap junction channels. These new findings are determinant for a better understanding on the cardiac impulse propagation in the healthy and diseased heart.

MATERIAL AND METHODS

Cell line and cell culture

Rat Liver Epithelial (RLE) cells that express endogenous Cx43 have been stably transfected with an inducible ecdysone promoter that permits the expression of accurate levels of Cx45 and ratios of Cx43:Cx45 (Desplantez et al., 2015; Grikscheit et al., 2008) by adding different concentrations of the inducer Ponasterone A (PonA): low induction 0.5 μ M, medium induction 1 μ M, and maximal induction 2 μ M. Three co-expression junctional ratio were studied: Cx43:Cx45 = 5.8, 2.3 and 1.

The RLE cell line was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 μ g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin, and kept in an incubator (37°C; 5% CO₂) and passaged at a 1/40 ratio by trypsin dissociation. Cells were seeded in 13 mm glass coverslips and used day 1 and 2 post-seeding for patch clamp recordings.

Patch clamp solutions

Patch clamp experiments were performed in a modified Krebs-Ringer solution (Desplantez et al., 2004) (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; HEPES, 5 (pH 7,4); sodium pyruvate, 2; glucose, 5. Patch pipettes were filled with internal solution (in mmol/L): potassium aspartate, 120; NaCl, 10; CaCl₂, 1; MgATP, 3; EGTA, 10 (pCa ~8); HEPES, 5 (pH 7.2). After filling the pipette resistance was 3-6 M Ω .

Electrophysiological measurements

Patch clamp experiments have been performed as previously described (Desplantez et al., 2004). Briefly, we performed electrical recordings on cell pairs seeded on glass coverslips by applying the dual voltage clamp method in the whole cell configuration. This method allows to control the membrane potential of each cell to establish a gradient of membrane potential (termed junction potential V_j) $V_j = V_{m2} - V_{m1}$, where V_{m1} and V_{m2} are the membrane potential of each cell, and record the gap junction current I_j (for more details see (Desplantez et al., 2004)).

Acquisition and analysis of electrophysiology data

Electrical coupling

The electrical coupling was determined by applying a V_j of low amplitude ($V_j = \pm 10$ mV) at which gap junction channels do not deactivate (see data and Figure 1A) and the corresponding junctional conductance $G_{j,0}$ was calculated as $G_{j,0} = I_j/V_j$. To prevent error of measurement caused by the series resistance R_s , $G_{j,0}$ was corrected after recording (Van Rijen et al., 1998).

Voltage dependence

The voltage gating of gap junction channels (*i.e.* voltage dependence, kinetics of deactivation) was determined by applying rectangular pulses (5 sec duration, steps amplitude $\Delta\pm 10$ mV) of positive and negative V_j polarities. For analysis, the amplitude of I_j was determined at the beginning (instantaneous $I_{j,inst}$) and end (steady-state $I_{j,ss}$) of each V_j pulse. The respective conductances were calculated as $g_{j,inst} = I_{j,inst} / V_j$ and $g_{j,ss} = I_{j,ss} / V_j$. $g_{j,ss}$ was normalized with respect to $g_{j,inst}$, sampled, averaged and plotted as a function of V_j ($g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$), which represents the voltage dependence of gap junction channels. The curve fitting of the relationships $g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$ was done with the Boltzmann equation separately applied to negative and positive V_j (Desplantez et al., 2004; Valiunas et al., 1999).

Kinetics of deactivation

The kinetics of deactivation of gap junction channels were analyzed by an exponential fit of the time course of I_j (see Results for more details), which yields a fast and/or slow time constant of deactivation: $\tau_{d,1}$ and $\tau_{d,2}$ respectively. The voltage dependence of $\tau_{d,1}$ was characterized by the relationship $\tau_{d,1}=f(V_j)$ that was fitted with a single exponential that determined the decay constant V_τ and the 0 mV intercept $\tau_{d,0}$.

Recovery from deactivation

The recovery was determined by applying a conditioned pulse P1 (duration 5 sec) of $V_j = \pm 10, \pm 60$ and ± 120 mV to trigger none, intermediate and maximal deactivation of gap junction channels, followed by short pulses P2 (2 ms) of similar amplitude and polarity applied at incremented interpulse intervals ($\Delta t = 5$ ms to 3 sec). The peak current amplitude of P1 and P2, I_{P1} and I_{P2} , were measured and their respective conductances g_{P1} and g_{P2} were calculated as $g_{Px} = I_{Px}/V_j$ and normalized as g_{P2}/g_{P1} . The time course of recovery was illustrated by plotting g_{P2}/g_{P1} in function of the time after P1 ($g_{P2}/g_{P1} = f(t)$). The recovery was estimated as complete for $g_{P2}/g_{P1} = 1$. The kinetics of recovery ($g_{P2}/g_{P1} = f(t)$) were best fitted with a linear regression for $V_j = 10$ mV characterized by a 0 ms intercept (y_0), and a double exponential regression for $V_j = 60$ mV and 120 mV described by a fast ($\tau_{r,1}$) and a slow ($\tau_{r,2}$) time constant of recovery.

Unitary conductances

Cell pairs were uncoupled with heptanol (2.5 mM) to record single channel currents i_j at different V_j gradients of either polarity with bipolar pulses ($V_j=\pm 30$ to ± 130 mV; $\Delta V_j = 20$ mV; 500 ms / polarity) that were analyzed to determine the unitary conductances as $\gamma_j=i_j/V_j$

and plotted in frequency histograms, fitted with a multiple Gaussian equation that yielded the mean conductances of gap junction channels (see results for more information).

Data acquisition and analysis

Voltage and current signals were stored with a PC for post-recording analysis. Current signals were Bessel-filtered (1 kHz) and digitized (3.33 kHz). Acquisition (sample rate 20 kHz) was done with Patchmaster software. Data analysis (measure of current amplitude and current fit) was done with Fit Master software (HEKA Elektronik, Lambrecht, 67466, Germany), curve fitting and statistics with SigmaPlot, (Systat Software Inc, San Jose, 95110, USA) and GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, 92037, USA).

Predicted voltage dependence

A theoretical voltage dependence of gap junction channels was calculated by estimating the formation of 2 populations of homotypic gap junction channels differently distributed in function of the ratios of Cx43:Cx45. Compared to our experimental data this permitted to estimate if the induction of expression of Cx45 induced the formation and the contribution of only homotypic gap junction channels in the electrical coupling, or if there is a different Cxs assembling and types of gap junction channels (*i.e.* heterotypic, heteromeric; see Results and (Grikscheit et al., 2008b)). The $g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$ relationships of homotypic Cx43 channels experimentally determined in non-induced cells and homotypic Cx45 channels from (Desplantez et al., 2004) were used as reference.

The theoretical $g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$ relationships were calculated as :

$$g_{j,ss} / g_{j,inst} = f(V_j) = \{p[(g_{j,ss} / g_{j,inst}) = f(V_j)]\} + \{q[(g_{j,ss} / g_{j,inst}) = f(V_j)]\}$$

where p and q are the respective percentage of homomeric-homotypic Cx43 and Cx45 gap junction channels at each $J_{Cx43:Cx40}$ at each ratio.

Data are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Junctional and non-junctional levels and ratios of connexins

The ratios of Cx43:Cx45 have been previously quantified by western blotting and co-immunoprecipitation recently described in (Desplantez et al., 2015; Grikscheit et al., 2008). Briefly, the concentrations of PonA allowed controlling the level of expression of Cx45: the higher the concentration, the higher the expression of Cx45 without modifying the level of expression of Cx43. The total ratio of Cx43:Cx45 have been quantified: at low induction Cx43:Cx45 = 0.5, at intermediate induction Cx43:Cx45 = 1, and at maximal induction Cx43:Cx45 = 2. Triton X100 extraction has been performed to separate the junctional ($J_{Cx43:Cx45}$) and non-junctional ($NJ_{Cx43:Cx45}$) fractions of connexins. The $J_{Cx43:Cx45}$ = 5.8, 2.3 and 1 at low, intermediate and maximal inductions, respectively (Desplantez et al., 2015).

Electrical recordings

Electrical coupling

The junctional current I_j elicited at $V_j = \pm 10$ mV did not decay with time (Figure 1A) that indicated that gap junction channels do not deactivate. The corresponding conductance $G_{j,0}$ was measured (Figure 1B, left panel). Non-induced cells displayed $G_{j,0} = 62,9 \pm 5,7$ nS. After induction we observed a similar lower $G_{j,0}$ at each ratio: $G_{j,0} = 39,4 \pm 4,0$ nS, $G_{j,0} = 43,9 \pm 2,5$ nS and $G_{j,0} = 44,7 \pm 3,3$ nS, for Cx43:Cx45 = 5.8, 2.3 and 1, respectively (Figure 1B, right panels).

Voltage dependence

Figure 2A (left panel) illustrates the junctional current I_j recorded in non-induced cells. I_j displayed a time and voltage dependent deactivation from an instantaneous state ($I_{j,inst}$) to a steady state level ($I_{j,ss}$): the higher the V_j , the more pronounced the deactivation. The steady state conductance $g_{j,ss}$ was normalized from the instantaneous conductance $g_{j,inst}$ ($g_{j,ss}/g_{j,inst}$) and plotted in function of V_j ($g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$; Figure 2A (right panel)) to characterize the voltage V_j -dependence of GJCs. A symmetrical V_j -dependence about $V_j = 0$ mV was observed, best fitted with a Boltzmann equation that yielded parameters characteristic of homotypic Cx43 channels (Table 1) (Desplantez et al., 2007, 2004; V Valiunas et al., 2000b).

After induction of Cx45 I_j still exhibited a time and voltage dependent deactivation (Fig. 2 B C and D, left panels) and a symmetrical and similar $g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$ voltage dependence at each ratio of Cx43:Cx45 (Fig. 2 B, C and D, right panels). Furthermore, the V_j -dependence is higher than homotypic Cx43 channels and lower than homotypic Cx45 channels mainly described by a lower V_{j0} and a lower $g_{j,min}$ (see table 1).

Predicted voltage dependence

The predicted V_j -dependence symmetrical behavior about $V_j = 0$ mV that is intermediate to the V_j -dependence of homomeric-homotypic Cx43 and Cx45 channels for each ratio of Cx43:Cx45: the higher the level of expression of Cx45, the higher the V_j sensitivity (figure 3).

Kinetics of deactivation

I_j decays in a single and a double exponential time course from $I_{j,inst}$ to $I_{j,ss}$ that mainly resulted from the response of the fast V_j gate for $50 \text{ mV} < V_j < 100 \text{ mV}$, and the concomitant response of the fast and the slow V_j gates for $V_j \geq 100 \text{ mV}$ (Bukauskas and Verselis, 2004) characterized by a fast $\tau_{d,1}$ ($\tau_{d,1}$) and slow $\tau_{d,2}$ ($\tau_{d,2}$) time constants of deactivation (Figure 4A). The V_j -dependence of $\tau_{d,1}$ ($\tau_{d,1}=f(V_j)$; Figure 4B) followed a mono exponential decay with V_j : the higher the V_j , the faster the deactivation. Moreover, we observed a dependence on the level of expression of Cx45: the higher the expression of Cx45 and the lower the ratio of Cx43:Cx45, the slower the deactivation..

Recovery from deactivation

Three V_j amplitudes were applied: $V_j = \pm 10$ mV at which channels do not gate (Figure 1A and 5A, left panel), $V_j = \pm 60$ mV $\approx V_{j,0}$ that cause an intermediate deactivation (Figure 5A, middle panel), and $V_j = \pm 120$ mV at which channels fully deactivate (Figure 5A, lower panel; for clarity only I_j recorded with non-induced cells is illustrated) were applied.

At $V_j=10$ mV (Figure 5B, upper panel) $I_{P2}=I_{P1}$ from the first pulse P2 applied after P1 ($t= 5$ ms) described by a constant $g_{P2}/g_{P1} = f(t)$ relationship best fitted with a linear regression that yielded the 0 ms intercept (y_0 ; see table 1).

At $V_j=60$ mV (Figure 5B, middle panel) channels displayed different kinetics in function of the level of expression of Cx45 and the ratio of Cx43:Cx45: the higher the expression the faster the recovery. More precisely, in non-induced cells a steady $g_{P2}/g_{P1} = 1$ occurred at $t \approx 10$ s. Induction of Cx45 led to a steady and lower g_{P2}/g_{P1} of 0.8 at $t \approx 10$ s for Cx43:Cx45 = 5.8 and 2.3, and at $t \approx 6$ s for Cx43:Cx45 = 1. Importantly $g_{P2}/g_{P1} < 1$ suggested an incomplete recovery of GJCs maintained in a deactivated/recovered state where the deactivation dominates.

At $V_j=120$ mV (Figure 5A, lower panel) in non-induced cells channels displayed a complete steady recovery at $t = 2$ s. After low and intermediate induction of Cx45 a higher g_{P2}/g_{P1} than in non-induced cells described by a steady $g_{P2}/g_{P1} \approx 1.15$ at $t=1$ s suggested an increased number of functional channels and an opposite equilibrium between the deactivation and the recovery of GJCs to the one at $V_j=60$ mV. On the contrary maximal

induction induced a steady $g_{P2}/g_{P1} \approx 0.9$ in $t \approx 1$ s indicating a change of the deactivated/recovered state of GJCs. At this amplitude the fast V_j -gate displayed similar fast kinetics independent on the ratio of Cx43:Cx45 whereas the kinetics of the slow V_j gate differed (Table 2) that indicates a determinant role of this gate in determining the equilibrated state of GJCs.

Unitary conductances

Cells were uncoupled with heptanol to record unitary current i_j that displayed a main and a residual i_j amplitudes characteristic of the main open state and the residual open state of channel (Banach and Weingart, 2000; Bukauskas et al., 2001; Desplantez et al., 2003); Figure 6, left panels), and more rarely a closed state (not shown). The respective residual and main conductances, γ_r and γ_m , have been calculated as $\gamma = i_j/V_j$ and plotted in frequency histograms best fit with a double Gaussian (solid line Figure 6, right panel). Each peak represents the mean γ_r and γ_m that characterize the principal channel population(s). In non-induced cells γ_r and γ_m are representative of homotypic Cx43 channels (Table 3 (Desplantez et al., 2011, 2007), which are lower at low and maximal inductions of Cx45 (Table 3). Moreover at intermediate induction two channel populations were observed that are represented by one γ_r and two γ_m (Table 3), one representing homotypic Cx43 GJCs ($\gamma_m \approx 60$ pS; see discussion) (Desplantez et al., 2011). Recordings were also used to estimate the respective contribution of channels. For instance a homomeric-homotypic channel was count as made of Cx43 and Cx45 when $\gamma_m \approx 60$ pS and $\gamma_r \approx 20$ pS and $\gamma_m \approx 30$ pS and $\gamma_r \approx 10$ pS were respectively observed at both polarities of V_j . Such channels were observed at low percentage (3% and 2% respectively) at low and maximal induction, while we did not observed homomeric-homotypic Cx45 channels at intermediate induction contrary to homomeric-homotypic Cx43 channels. On the contrary we observed $\approx 75\%$ and $\approx 20\%$ of symmetrical and asymmetrical γ_m and γ_r of different values to homomeric-homotypic channels that confirmed a different connexin assembling than in non-induced cells and that is not function of the ratio of Cx43:Cx45.

DISCUSSION

This work characterized the formation and the electrical properties of gap junction channels in accurate ratios of co-expressed Cx43 and Cx45 in the RLE Ind45 cell line. Previous studies have characterized the properties of homotypic, heterotypic and heteromeric gap junction channels but did not determine their relative contribution in the electrical coupling. Our study advances this knowledge well illustrated by the observed indirect relationship between biochemical (Desplantez et al., 2015) and functional characterization of gap junction channels. Altogether our data revealed the dominant contribution of heteromeric gap junction channels in the electrical coupling. Interestingly, their multichannel and single channel electrical properties suggest a low dependence on the level of expression of Cx43 and Cx45 and ratios of Cx43:Cx45, on the contrary to a co-expression of Cx43 and Cx40 (Chaigne et al., 2015). This further improves the knowledge on the function of the specific patterns of expression of connexins in tissue. For instance in the heart they regulate the electrical impulse propagation and heart function that become arrhythmic in case of a pathological remodeling such as in atrial fibrillation (Beauchamp et al., 2012, p. 2004; Philippe Beauchamp et al., 2006; Bikou et al., 2011; Kato et al., 2012; Yang et al., 2010).

First of all it is important to note that electrical properties of homotypic Cx43 channels (Desplantez et al., 2011, 2007, 2004; V Valiunas et al., 2000b) but not of homotypic Cx45, heterotypic Cx43/Cx45 and heteromeric Cx43-Cx45 channels (Desplantez et al., 2004; Martinez et al., 2002) in non-induced cells confirmed the absence of expression of Cx45 (Desplantez et al., 2015). This excluded a misinterpretation of data due to a level of expression under the limit of detection (McCain et al., 2012) and leak of expression of Cx45 without induction [20].

As a first observation each level of expression of Cx45 similarly decreased $G_{j,0}$. This is caused by channels of lower unitary conductances that indicated the contribution of Cx45 (Desplantez et al., 2011). This is conjugated to a lower size of the gap junction (Grikscheit et al., 2008b) and lower amount of coupling channels. The latter was estimated as $n = G_{j,0}/\gamma_m$: $n \approx 1033$ in non-induced cells, and $n \approx 730, 743$ to 965 , and 852 at low, intermediate and maximal induction of Cx45, respectively. Similarly, independently to its level of expression Cx45 slightly increased the V_j -dependence of channels, which was unexpected because of a higher V_j -dependence than Cx43 in their respective homotypic configuration (Desplantez et al., 2004). This suggested a dominant and similar contribution of Cx43 and a similar connexin composition of channels in which the V_j -sensor of Cx43 governed the gating. However the higher the expression of Cx45, the slower the deactivation that is similar to homotypic Cx45 channels at maximal expression (Desplantez et al., 2011), which indicated the higher the inhibition of Cx45 on the fast V_j -gate of Cx43 either in the heterotypic configuration (Elenes et al., 2001) or between adjacent Cx43 and Cx45 in heteromeric hemichannel.

Importantly, our new findings on the recovery displayed a similar but inverted dependence on the expression of Cx45 and V_j : the higher the expression and V_j , the faster the recovery. This reflects a similar inverted mechanism of the extracellular loops for the “loop” slow gating and the cytoplasmic and TM2 domains for the fast V_j gating (Bargiello et al., 2012; Barrio et al., 1997; Bukauskas and Verselis, 2004; Wang et al., 1996) implicated in the deactivation.

Because the V_j -gating of channels decreases the V_j (Bukauskas and Verselis, 2004), this most likely induced the recovery of channels. This chronological response determined an equilibrium between a deactivated and a recovered state. In this sense the different g_{P2}/g_{P1} observed in the recovery reflected different competitive response of the fast and the slow V_j -gates of each connexin in function of the level of expression of Cx45 and the amplitude of V_j . For instance $g_{P2}/g_{P1} < 1$ reflected a dominance of the deactivation contrary to $g_{P2}/g_{P1} > 1$. Moreover the $g_{P2}/g_{P1} \neq 1$ only observed with the expression of Cx45 indicate the formation of heterotypic and heteromeric GJCs channels that are either closed not in the main open state at $V_j = 0\text{mV}$ (Desplantez et al., 2007, 2004; Martinez et al., 2002).

Importantly, the complementary analysis of the frequency distribution of unitary conductances of single recording indicated different the dominant contribution of one channel population where homotypic Cx43 and Cx45 channels poorly contribute (Desplantez et al., 2011, 2007). This matches the predicted V_j -dependence, except at intermediate induction where homotypic Cx43 channels appear to contribute more ($\gamma_m = 59\text{ pS}$) but not homotypic Cx45 channels and demands further investigations. Similarly, homomeric-heterotypic Cx43-Cx45 channels rarely contribute. Altogether this indicated a dominant contribution of heteromeric Cx43-Cx45 channels, estimated to $\approx 80\%$, as in co-transfected cells with Cx43 and Cx45 (Desplantez et al., 2004; Martinez et al., 2002) and ventricular myocytes (Beauchamp, 2004). Interestingly, this was unexpected when related to the degree of Cx43+Cx45 hetero-oligomerization ($< 10\%$; (Desplantez et al., 2015)) and reflected a regulation to favor their functional contribution independently on the level of expression of Cx45 and ratio of Cx43:Cx45.

Finally, the frequency distribution of unitary conductances could permit to estimate the composition of channels. The easier way based on the $\gamma_m = 50\text{ pS}$ closer to the γ_m of homotypic Cx43 than homotypic Cx45 channels (Desplantez et al., 2011) would represent a higher and identical amount of Cx43 than Cx45 at each ratio. However, this needs further investigation because we cannot exclude that Cx43/Cx45 hetero-oligomerization leads to unpredicted electrical properties.

Physiological significance

Our new findings further explore the role of specific patterns of expression of Cx43 and Cx45, which are for example co-expressed at varying physio-pathological ratios in ventricular myocytes (Alcoléa et al., 1999; Bao et al., 2011; Gros and Jongsma, 1996; Severs et al., 2008). Indeed, the dominant contribution of heteromeric channels made of

a similar connexin composition at each co-expressing ratio investigated. This matches previous observations despite a low formation (Beauchamp et al., 2004, p. 2004; Desplantez et al., 2015, 2004), which indicated an indirect relationship between the functional contribution and the biochemical distribution of channels (Desplantez et al., 2015). In addition we importantly show that the ratios differently modified electrical properties of gap junction channels in function of the level of expression of Cx45 and the ratio of Cx43:Cx45. This most likely differently regulate the impulse propagation (see below). Interestingly our similar study on co-expressed Cx40+Cx43 indicated also a dependence on the type of Cxs.

Out of these properties the determinant findings on recovery, even if obtained by applying a constant V_j , indicate that GJCs are in an equilibrium between a deactivated and recovered state. Of course a constant V_j almost never occurs *in-vivo* where the profile and the gradient of V_j depend on the profile of the AP and the time delay of cell-cell AP propagation. When established the V_j first induces a deactivation of GJCs that decreases the amplitude of V_j (Bukauskas and Verselis, 2004) and consequently induces the recovery. This consequently might induce a constant flickering of channels between a deactivated and recovered state and a constant varying amplitude of the current source I_j to regulate the delay of initiation of the action potential in the sink cell. Moreover, our data suggest that the co-expression Cx45+Cx43, contrary to single expression of Cx43, limits the electrical coupling mainly by lowering $G_{j,0}$ and increasing the V_j -sensitivity, which reduce the amplitude of I_j and delay the initiation of the action potential in the sink cell. Because Cx43 and Cx45 are expressed in different cardiac tissues, well-illustrated by a non-uniform distribution in ventricular myocytes from the endocardial to the epicardial regions (Severs et al., 2008), this is critical to ensure specific conduction velocity and heart function (for review : (Kléber et al., 2001)). To improve the knowledge on this function ongoing investigations are determining the physio-pathological threshold ratio of Cx43:Cx45 by modifying the level of expression of Cx43 and by simulating *in-vivo* profiles of V_j .

Fundings

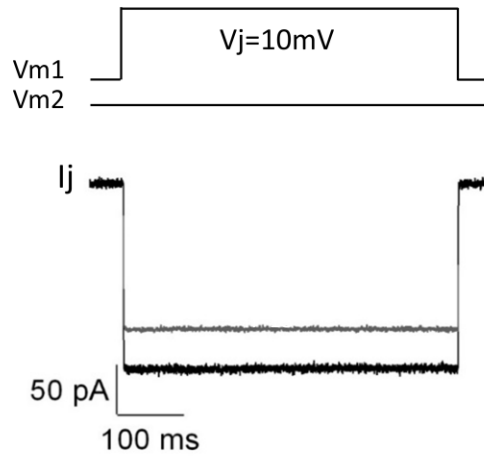
The work was supported by the Région d'Aquitaine [# 2011-0153], the Agence National de la Recherche [# ANR-10-IAHU-04], and the European Union Seventh Framework Programme (EUTRAF) under Grant Agreement (# FP7/2007-2013 - HEALTH-F2-2010-261057).

Disclosure

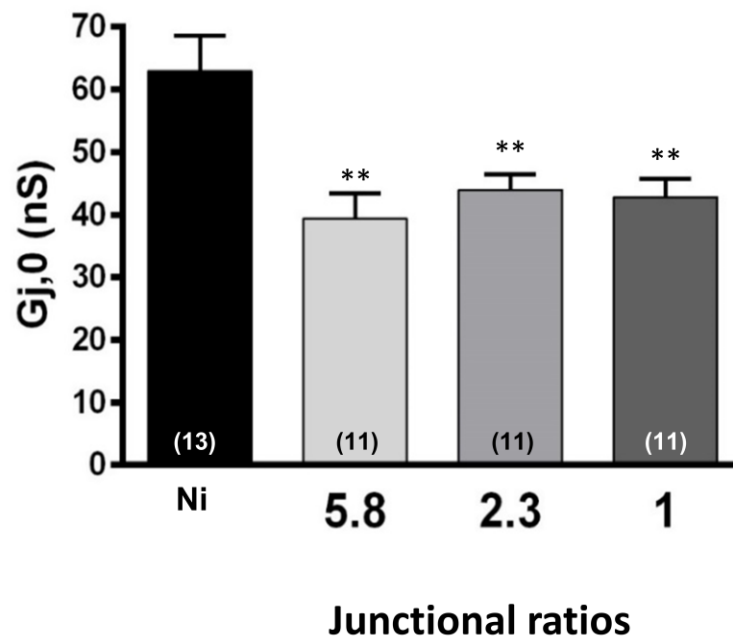
None

FIGURES AND TABLES

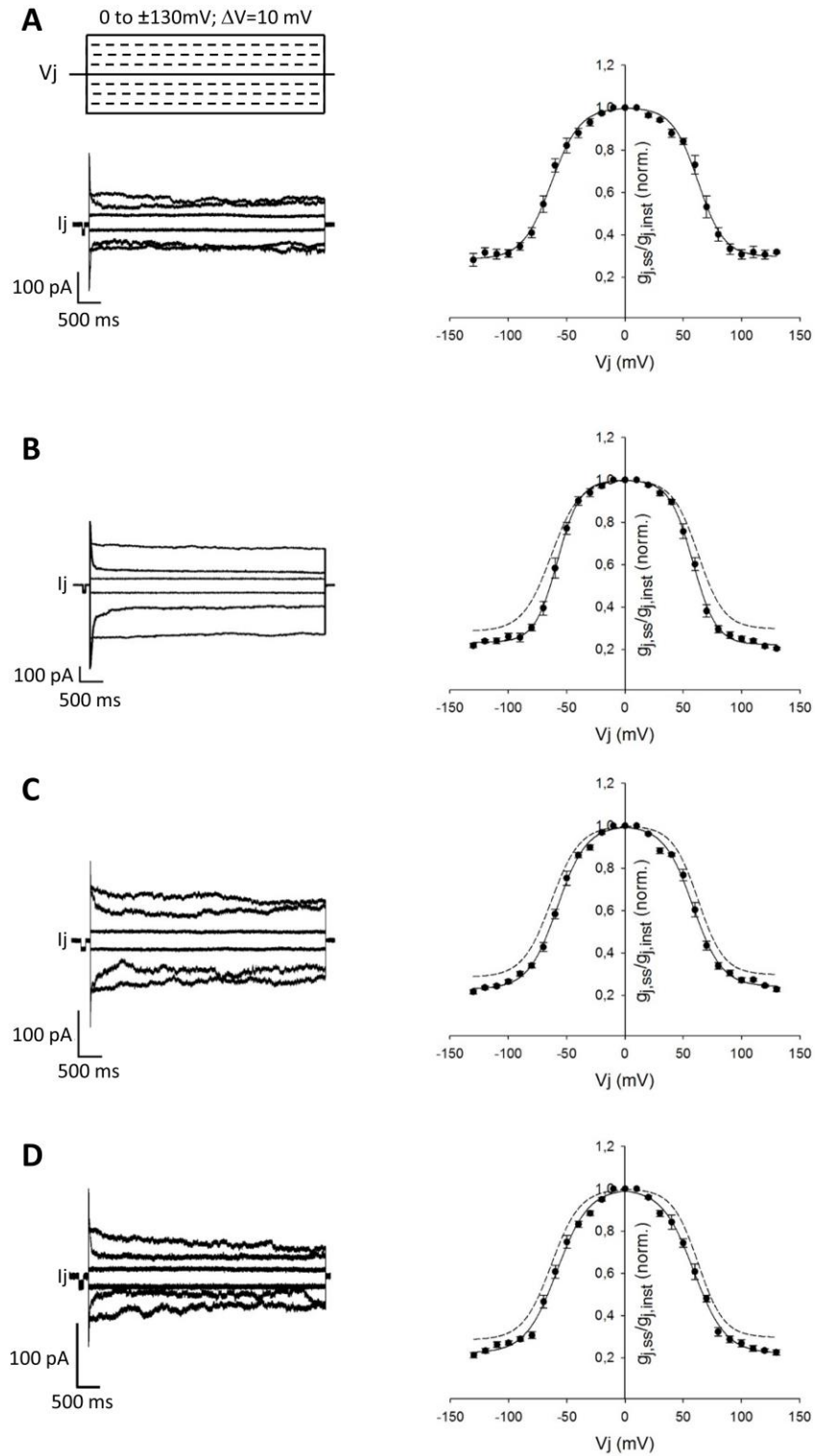
A



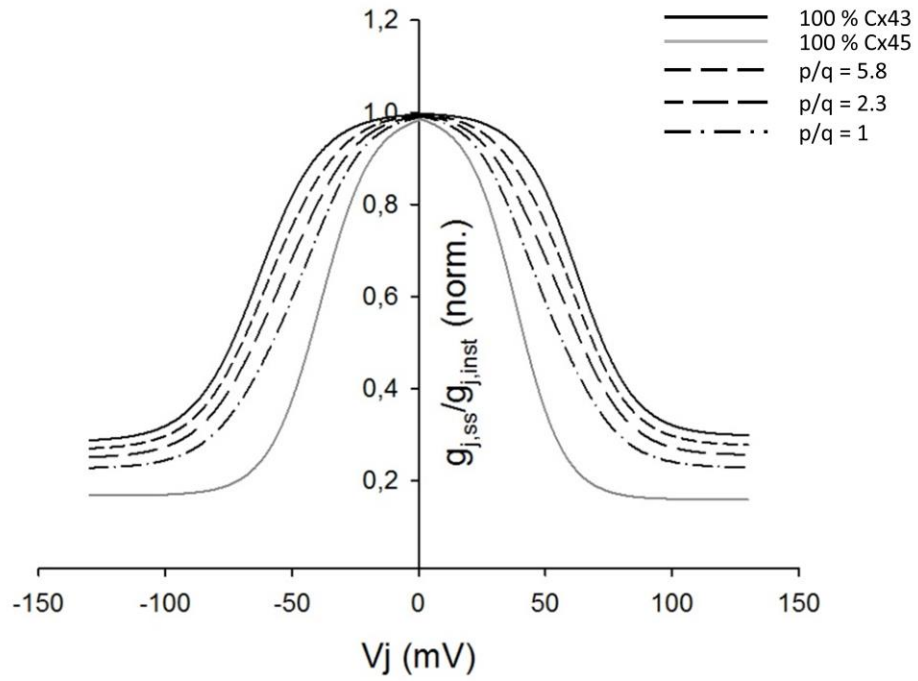
B



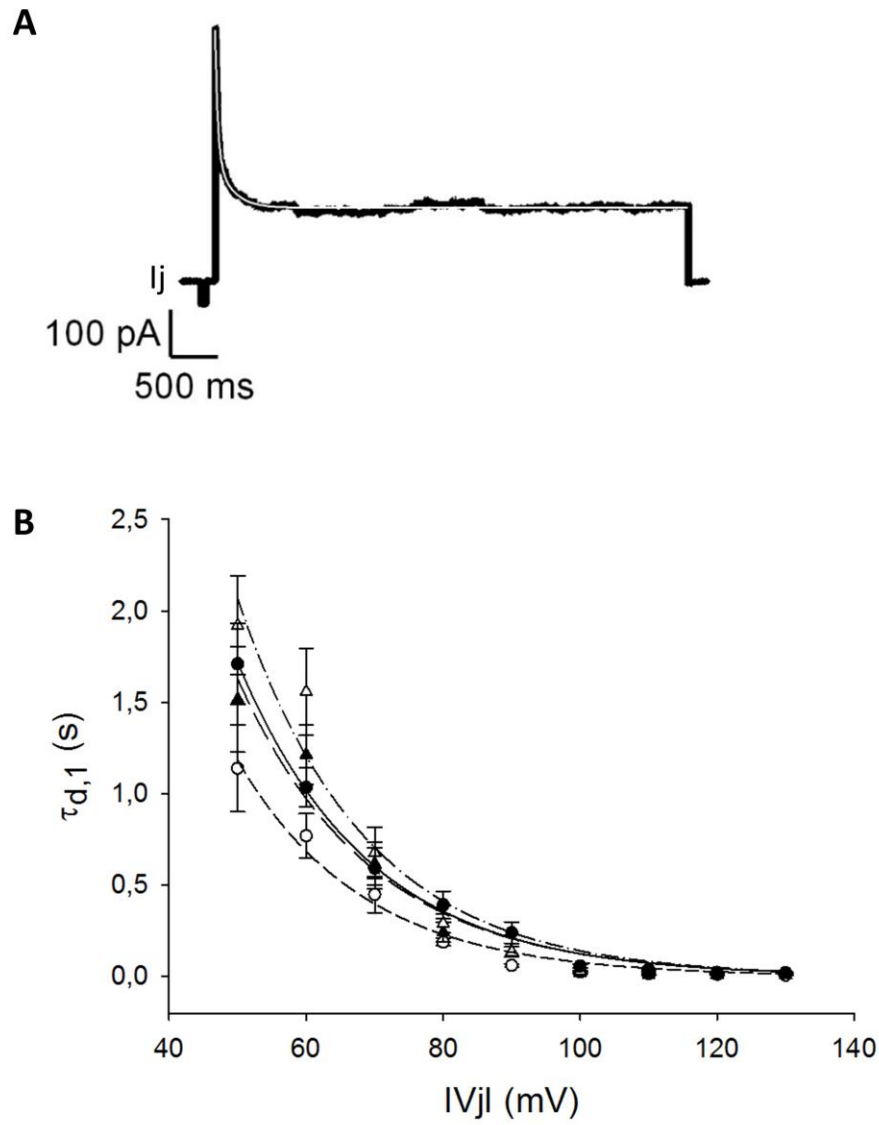
Dupuis et al Figure 1



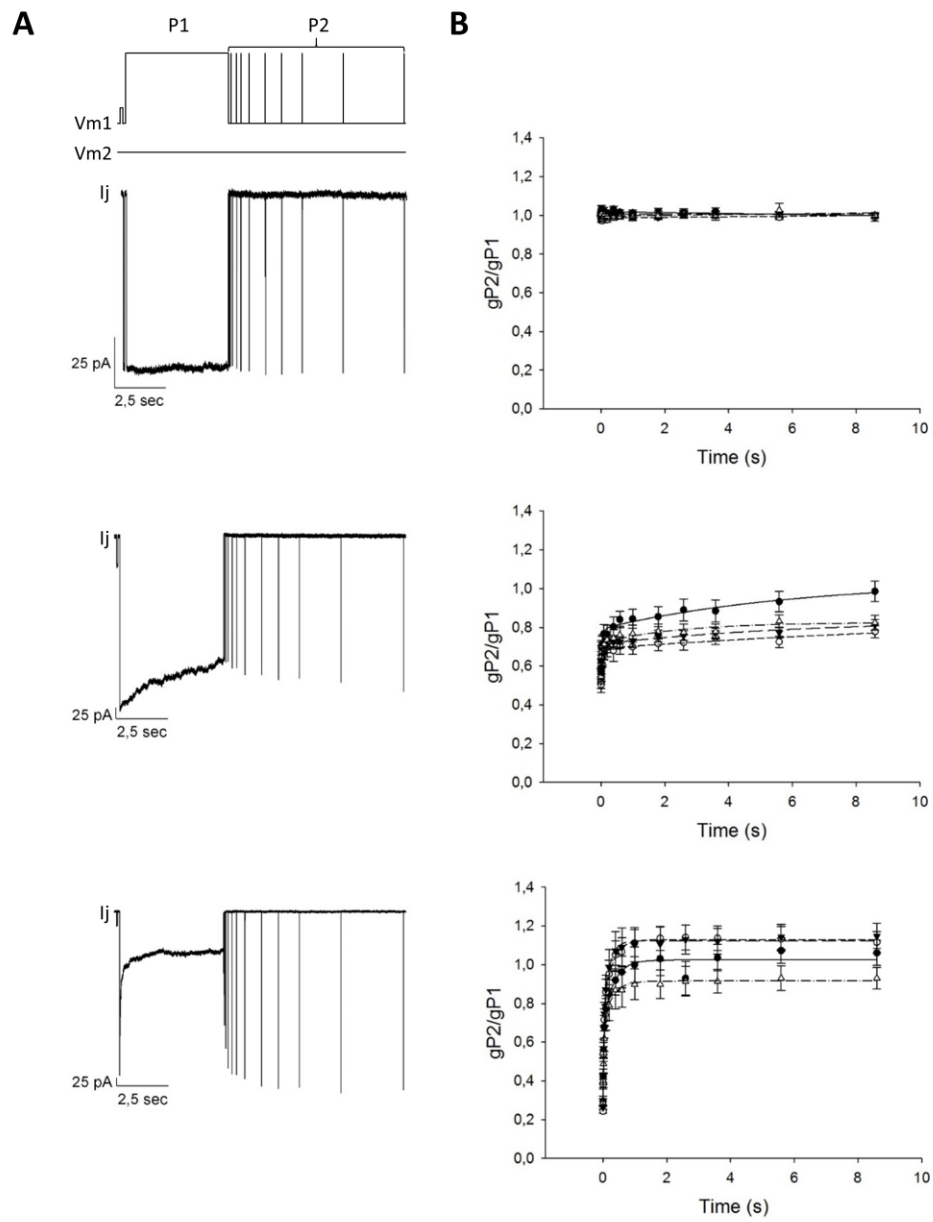
Dupuis et al Figure 2



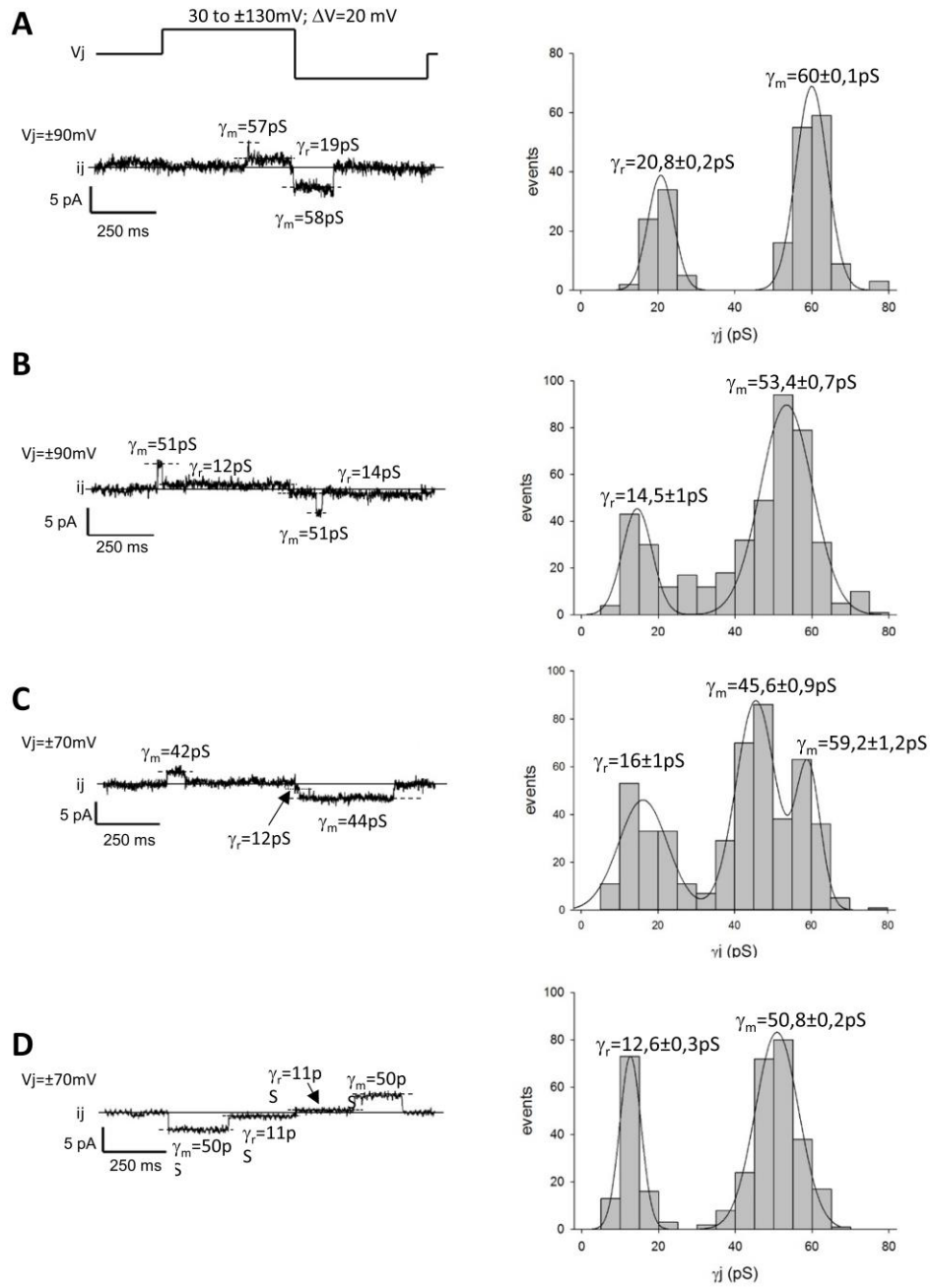
Dupuis et al Figure 3



Dupuis et al Figure 4



Dupuis et al Figure 5



Dupuis et al Figure 6

Cx43:Cx45 ratios	Electrical coupling	Voltage gating			Kinetics of deactivation	
	G _{j,0} (nS)	V _{j,0} (mV)	g _{j,min} (normalized)	z (a.u.)	τ _{d,0} (s)	V _τ (mV)
Ni	62±5	-63±1.0/63±1.0	0.3±0.1/0.3±0.1	2.1±0.1/2.2±0.2	20.5±2.6	20.3±3.8
5.8	39±4	-58±0.4/58±0.6	0.2±0.1/0.2±0.1	2.6±0.1/2.5±0.1	14.0±3.8	20.9±1.8
2.3	44±2	-58±0.7/58±1.0	0.2±0.1/0.2±0.1	2.1±0.1/2.1±0.1	14.8±6.0	23.4±1.1
1	43±3	-59±1.0/59±0.9	0.2±0.1/0.2±0.1	1.9±0.1/1.9±0.1	17.3±7.0	24.2±1.2

Dupuis et al Table 1

Cx43:Cx45 ratios	y ₀ (s)	τ _{r,1} (s)		τ _{r,2} (s)		t _{steady-state} of g _{P2} /g _{P1} (s)	
	V _j = ± 10mV	60 mV	120 mV	60 mV	120 mV	60 mV	120 mV
Ni	1.02	51	16	10000	357	10 s	2 s
5.8	0.98	36	21	10000	270	10 s	1 s
2.3	1.01	58	16	5000	185	10 s	1 s
1	0.99	38	18	3333	322	6 s	1 s

Dupuis et al Table 2

Cx43:Cx45 ratios	γ_m (pS)	γ_r (pS)	Homomeric-homotypic Cx43	Homomeric-homotypic Cx45	Symmetrical gap junction channels	Asymmetrical gap junction channels
Ni	60.0±0.1	20.8±0.2	100%	0%	100%	0%
5.8	53.4±0.7	14.5±1	2,4%	1,6%	78%	22%
2.3	45.6±0.9 59.2±1.2	16.0±1.0	3,4%	1,7%	73%	27%
1	50.8±0.2	12.6±0.3	2,5%	0%	74%	26%

Dupuis et al Table 2

FIGURES AND TABLES LEGENDS

Figure 1: Electrical intercellular coupling $G_{j,0}$. **A** : Protocol applied and example of I_j (black line: non-induced; grey line: Cx43:Cx45=2.3). **B** : Averaged $G_{j,0}$. Induction of Cx45 similarly decreased $G_{j,0}$ at each condition. Asterisks denote statistical difference (** $P < 0.01$) between non-induced and induced cells, t-test. ((n): number of experiments)

Figure 2: Voltage dependence of gap junction channels of non-induced and induced cells. Left panels: Example of I_j for $V_j = \pm 10, 60$ and 110 mV. Right panels: Voltage dependence of $g_{j,ss}/g_{j,inst}$ on V_j . **A**: top inset: pulse protocol; bottom inset: averaged $g_{j,ss}/g_{j,inst} = f(V_j)$ relationship for non-induced cells ($n=10$). **B**: Cx43:Cx45=5.8 ($n=11$) **C**: Cx43:Cx45=2.3 ($n=11$) and **D**: Cx43:Cx45=1 ($n=11$). In each figure the solid line represents the best fit of data to a Boltzmann's equation of the condition illustrated; in B, C and D the dashed curve is the best fit of data of the non-induced condition.

Figure 3: theoretical V_j -dependence $g_{j,ss} = f(V_j)$ for populations of homotypic Cx43 and Cx45 gap junction channels at different proportions p and q : 85,3%/14,7%; 69,7%/30,3% and 50%/50% for Cx43:Cx45=5.8, 2.3 and 1 respectively. Inset: Solid curves : data of 100 % homotypic Cx43 (experimental results) and Cx45 (Desplantez et al., 2004). Dashed curves correspond to prediction for the different proportions (see figure).

Figure 4 : Kinetics of deactivation of gap junction channels. **A** : Example of I_j recorded in non-induced cells for $V_j = -120$ mV. The superimposed white solid line shows the bi-exponential regression of data $\text{---}\bullet\text{---}$ characterized by a fast ($\tau_{d,1}$) and a slow ($\tau_{d,2}$) time constant of deactivation. In this example: $\tau_{d,1} = 22$ ms and $\tau_{d,2} = 192$ ms. **B** : Time course of $\tau_{d,1}$ versus V_j , : non-induced (; $n=8$); : Cx43:Cx45=5.8 (—●—; $n=8$); : Cx43:Cx45=2.3 (—▲—; $n=8$) and Cx43:Cx45=1 (—△—, $n=10$). The fit curve follow a mono-exponential regression characterized by a decay constant ($V\tau$) and a 0mV intercept ($\tau_{d,0}$) (table 1).

Figure 5 : Recovery from deactivation of gap junction channels. **A**: *Upper left inset*: pulse protocol. *Bottom left inset*: examples of I_j observed with non-induced cells for $V_j = \pm 10$ mV (top), $V_j = \pm 60$ mV (middle) and $V_j = \pm 120$ mV (bottom). **B** : $g_{P2}/g_{P1} = f(t)$ non-induced (—●—; $n=8$), Cx43:Cx45=5.8 (—●—; $n=8$), Cx43:Cx45=2.3 (—▲—; $n=8$) and Cx43:Cx45=1 (—△—, $n=10$) for $V_j = \pm 10, \pm 60$ and ± 120 mV.

Figure 6: Single channel conductances. *Upper panel*: pulse protocol. *Left panels*: current signal, I_j . Solid line: zero current level. Dashed line: main state. Pointed line: residual state.

Right panels: Frequency histogram of unitary conductances. The curves are best fit of data to multiple Gaussians. **A:** non-induced (n=15; N=208), **B:** Cx43:Cx45=5.8 (n=20; N=433), **C:** Cx43:Cx45=2.3 (n=20; N=472) and **D:** Cx43:Cx45=1 (n=21; N=365). n: number of cell pairs; N: number of events observed.

Table 1: Boltzmann parameters of voltage gating and kinetics of deactivation.

$G_{j,0}$: electrical intercellular coupling; $V_{j,0}$: V_j at which $g_{j,ss}$ is half-maximally inactivated; $g_{j,min}$: minimal conductance at large V_j ; z : equivalent number of unitary positive charges q moving through the electric field applied. V_τ : decay constant, i.e., characteristic measure for the decay of $\tau_{d,1}$ with V_j ; $\tau_{d,0}$, zero V_j intercept, i.e., value of $\tau_{d,1}$ extrapolated to $V_j = 0$ mV.

Table 2 : Electrical parameters of gap junction channels recovery after inactivation. $\tau_{r,1}$ and $\tau_{r,2}$: values of the fast and slow time constant of the recovery after deactivation respectively. Plateau value: value where $gP2/gP1$ reach the maximum of the recovery after deactivation.

Table 3 : Unitary conductances and distribution of gap junction channels. γ_m and γ_r : conductance of the main open state and the residual open state respectively. Proportions of homomeric-homotypic Cx43 and Cx45 gap junction channels and channels that displayed symmetrical and asymmetrical conductances (see text for more details).

REFERENCES

- Agullo-Pascual, E., Reid, D.A., Keegan, S., Sidhu, M., Fenyő, D., Rothenberg, E., Delmar, M., 2013. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc. Res.* 100, 231–240. doi:10.1093/cvr/cvt191
- Alcoléa, S., Théveniau-Ruissy, M., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Tzouanacou, E., Chauvin, J.P., Briand, J.P., Moorman, A.F., Lamers, W.H., Gros, D.B., 1999. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ. Res.* 84, 1365–1379.
- Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., DiFrancesco, D., 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 549, 347–359. doi:10.1113/jphysiol.2002.027698
- Anderson, C.L., Zundel, M.A., Werner, R., 2005. Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. *Genomics* 85, 238–244. doi:10.1016/j.ygeno.2004.11.007
- Anderson, R.H., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Moorman, A.F.M., 2013. The anatomy of the conduction system: implications for the clinical cardiologist. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 187–196. doi:10.1007/s12265-012-9433-0
- Anumonwo, J.M., Taffet, S.M., Gu, H., Chanson, M., Moreno, A.P., Delmar, M., 2001. The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels 666–673.
- Atkinson, M.M., Lampe, P.D., Lin, H.H., Kollander, R., Li, X.R., Kiang, D.T., 1995. Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 9), 3079–3090.
- Banach, K., Weingart, R., 2000. Voltage gating of Cx43 gap junction channels involves fast and slow current transitions 248–250.
- Bao, M., Kanter, E.M., Huang, R.Y.-C., Maxeiner, S., Frank, M., Zhang, Y., Schuessler, R.B., Smith, T.W., Townsend, R.R., Rohrs, H.W., Berthoud, V.M., Willecke, K., Laing, J.G., Yamada, K.A., 2011. Residual Cx45 and its relationship to Cx43 in murine ventricular myocardium. *Channels Austin Tex* 5, 489–499. doi:10.4161/chan.5.6.18523
- Bargiello, T.A., Tang, Q., Oh, S., Kwon, T., 2012. Voltage-dependent conformational changes in connexin channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1807–1822. doi:10.1016/j.bbamem.2011.09.019
- Barrio, L.C., Capel, J., Jarillo, J.A., Castro, C., Revilla, A., 1997. Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 73, 757–769. doi:10.1016/S0006-3495(97)78108-6
- Baruscotti, M., Bucchi, A., DiFrancesco, D., 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol. Ther.* 107, 59–79. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.01.005
- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., Saffitz, J.E., 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* 83, 629–635.
- Beauchamp, P., Choby, C., Desplantez, T., de Peyer, K., Green, K., Yamada, K.A., Weingart, R., Saffitz, J.E., Kléber, A.G., 2004. Electrical propagation in synthetic ventricular myocyte strands from germline connexin43 knockout mice. *Circ. Res.* 95, 95 (2): 170-178. doi:10.1161/01.RES.0000134923.05174.2f
- Beauchamp, P., Desplantez, T., McCain, M.L., Li, W., Asimaki, A., Rigoli, G., Parker, K.K., Saffitz, J.E., Kleber, A.G., 2012. Electrical coupling and propagation in engineered ventricular myocardium with heterogeneous expression of connexin43. *Circ. Res.* 110, 1445–1453. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259705
- Beauchamp, P., Yamada, K.A., Baertschi, A.J., Green, K., Kanter, E.M., Saffitz, J.E., Kleber, A.G., 2006. Relative Contributions of Connexins 40 and 43 to Atrial Impulse Propagation in Synthetic Strands

- of Neonatal and Fetal Murine Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 99, 1216–1224.
doi:10.1161/01.RES.0000250607.34498.b4
- Bedner, P., Niessen, H., Odermatt, B., Kretz, M., Willecke, K., Harz, H., 2006. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 281, 6673–6681.
doi:10.1074/jbc.M511235200
- Belluardo, N., White, T.W., Srinivas, M., Trovato-Salinaro, A., Ripps, H., Mudò, G., Bruzzone, R., Condorelli, D.F., 2001. Identification and functional expression of HCx31.9, a novel gap junction gene. *Cell Commun. Adhes.* 8, 173–178.
- Bennett, M.V., Zheng, X., Sogin, M.L., 1994. The connexins and their family tree. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 49, 223–233.
- Berenfeld, O., Zaitsev, A.V., 2004. The muscular network of the sheep right atrium and frequency-dependent breakdown of wave propagation. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 1053–1061. doi:10.1002/ar.a.20106
- Bers, D.M., Perez-Reyes, E., 1999. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.* 42, 339–360.
- Betsuyaku, T., Nnebe, N.S., Sundset, R., Patibandla, S., Krueger, C.M., Yamada, K.A., 2006. Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H163-171. doi:10.1152/ajpheart.01308.2004
- Beyer, E.C., Gemel, J., Martínez, A., Berthoud, V.M., Valiunas, V., Moreno, A.P., Brink, P.R., 2001. Heteromeric mixing of connexins: compatibility of partners and functional consequences. *Cell Commun. Adhes.* 8, 199–204.
- Beyer, E.C., Paul, D.L., Goodenough, D.A., 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver 2621–2629.
- Bikou, O., Thomas, D., Trappe, K., Lugenbiel, P., Kelemen, K., Koch, M., Soucek, R., Voss, F., Becker, R., Katus, H.A., Bauer, A., 2011. Connexin 43 gene therapy prevents persistent atrial fibrillation in a porcine model. *Cardiovasc. Res.* 92, 218–225. doi:10.1093/cvr/cvr209
- Björkman, N., 1962. A STUDY OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE GRANULOSA CELLS OF THE RAT OVARY. *Cells Tissues Organs* 51, 125–147. doi:10.1159/000141943
- Bonda, T.A., Sznaka, B., Sokołowska, M., Dziemidowicz, M., Winnicka, M.M., Chyczewski, L., Kamiński, K.A., 2015. Remodeling of the intercalated disc related to aging in the mouse heart. *J. Cardiol.* doi:10.1016/j.jjcc.2015.10.001
- Bruce, A.F., Rothery, S., Dupont, E., Severs, N.J., 2008. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc. Res.* 77, 757–765. doi:10.1093/cvr/cvm083
- Bukauskas, F.F., Bukauskiene, A., Bennett, M.V.L., Verselis, V.K., 2001. Gating Properties of Gap Junction Channels Assembled from Connexin43 and Connexin43 Fused with Green Fluorescent Protein. *Biophys. J.* 81, 137–152. doi:10.1016/S0006-3495(01)75687-1
- Bukauskas, F.F., Elfgang, C., Willecke, K., Weingart, R., 1995. Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells 2289–2298.
- Bukauskas, F.F., Jordan, K., Bukauskiene, A., Bennett, M.V., Lampe, P.D., Laird, D.W., Verselis, V.K., 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells 2556–2561.
- Bukauskas, F.F., Peracchia, C., 1997. Two distinct gating mechanisms in gap junction channels: CO₂-sensitive and voltage-sensitive. *Biophys. J.* 72, 2137–2142. doi:10.1016/S0006-3495(97)78856-8
- Bukauskas, F.F., Verselis, V.K., 2004. Gap junction channel gating. *Biochim. Biophys. Acta* 1662, 42–60. doi:10.1016/j.bbamem.2004.01.008

- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- Chaigne, S., Dupus, S., Desplantez, T., 2015. Specific GJCs make-up in function of accurate ratios of Cx40/Cx43 and Cx43/Cx45. *Abstr. Book - Int. Gap Junction Conf. Valpso. 2015* 1, 16.
- Colussi, C., Rosati, J., Straino, S., Spallotta, F., Berni, R., Stilli, D., Rossi, S., Musso, E., Macchi, E., Mai, A., Sbardella, G., Castellano, S., Chimenti, C., Frustaci, A., Nebbioso, A., Altucci, L., Capogrossi, M.C., Gaetano, C., 2011. Nε-lysine acetylation determines dissociation from GAP junctions and lateralization of connexin 43 in normal and dystrophic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2795–2800. doi:10.1073/pnas.1013124108
- Cooper, C.D., Lampe, P.D., 2002. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 44962–44968. doi:10.1074/jbc.M209427200
- Coppen, S.R., Gourdie, R.G., Severs, N.J., 2001. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp. Clin. Cardiol.* 6, 17–23.
- Coppen, S.R., Kaba, R.A., Halliday, D., Dupont, E., Skepper, J.N., Elneil, S., Severs, N.J., 2003. Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart 121–127.
- Coppen, S.R., Kodama, I., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Takagishi, Y., Honjo, H., Yeh, H.I., Severs, N.J., 1999a. Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border 907–918.
- Coppen, S.R., Severs, N.J., Gourdie, R.G., 1999b. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart 82–90.
- Cottrell, G.T., Burt, J.M., 2001. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons C1559-1567.
- Cottrell, G.T., Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Lau, A.F., Burt, J.M., 2003. Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C511-520. doi:10.1152/ajpcell.00214.2002
- Cottrell, G.T., Wu, Y., Burt, J.M., 2002. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1469-1482. doi:10.1152/ajpcell.00484.2001
- DeBerg, H.A., Brzovic, P.S., Flynn, G.E., Zagotta, W.N., Stoll, S., 2016. Structure and Energetics of Allosteric Regulation of HCN2 Ion Channels by Cyclic Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 291, 371–381. doi:10.1074/jbc.M115.696450
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., Théveniau-Ruissy, M., 1997. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system 423–437.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., Théveniau-Ruissy, M., 1995. Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system 358–371.
- Desplantez, T., Dupont, E., Severs, N.J., Weingart, R., 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J. Membr. Biol.* 218, *Journal of Membrane Biology.* 218 (1/3): 13-28. doi:10.1007/s00232-007-9046-8
- Desplantez, T., Grikscheit, K., Thomas, N.M., Peters, N.S., Severs, N.J., Dupont, E., 2015. Relating specific connexin co-expression ratio to connexon composition and gap junction function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 89, 195–202. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.008
- Desplantez, T., Halliday, D., Dupont, E., Severs, N.J., Weingart, R., 2011. Influence of v5/6-His tag on the properties of gap junction channels composed of connexin43, connexin40 or connexin45. *J. Membr. Biol.* 240, 139–150. doi:10.1007/s00232-011-9352-z

- Desplantez, T., Halliday, D., Dupont, E., Weingart, R., 2004. Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 363–375. doi:10.1007/s00424-004-1250-0
- Desplantez, T., Marics, I., Jarry-Guichard, T., Veteikis, R., Briand, J.-P., Weingart, R., Gros, D., 2003. Characterization of zebrafish Cx43.4 connexin and its channels. *Exp. Physiol.* 88, 681–690.
- Desplantez, T., McCain, M.L., Beauchamp, P., Rigoli, G., Rothen-Rutishauser, B., Parker, K.K., Kleber, A.G., 2012. Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current. *Cardiovasc. Res.* 94, 58–65. doi:10.1093/cvr/cvs025
- Dhillon, P.S., Gray, R., Kojodjojo, P., Jabr, R., Chowdhury, R., Fry, C.H., Peters, N.S., 2013. Relationship between gap-junctional conductance and conduction velocity in mammalian myocardium. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 6, 1208–1214. doi:10.1161/CIRCEP.113.000848
- Dupont, E., Matsushita, T., Kaba, R.A., Vozzi, C., Coppén, S.R., Khan, N., Kaprielian, R., Yacoub, M.H., Severs, N.J., 2001. Altered Connexin Expression in Human Congestive Heart Failure 359–371.
- Ek Vitorin, J.F., Pontifex, T.K., Burt, J.M., 2016. Determinants of Cx43 Channel Gating and Permeation: The Amino Terminus. *Biophys. J.* 110, 127–140. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.054
- Elenes, S., Martinez, A.D., Delmar, M., Beyer, E.C., Moreno, A.P., 2001b. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys. J.* 81, 1406–1418. doi:10.1016/S0006-3495(01)75796-7
- Foote, C.I., Zhou, L., Zhu, X., Nicholson, B.J., 1998. The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140, 1187–1197.
- Frank, M., Wirth, A., Andrié, R.P., Kreuzberg, M.M., Dobrowolski, R., Seifert, G., Offermanns, S., Nickenig, G., Willecke, K., Schrickel, J.W., 2012. Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ. Res.* 111, 1528–1538. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.270561
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503–507. doi:10.1126/science.1068793
- Goldberg, G.S., Moreno, A.P., Lampe, P.D., 2002. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* 277, 36725–36730. doi:10.1074/jbc.M109797200
- Gourdie, R.G., Green, C.R., Severs, N.J., 1991. Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 1), 41–55.
- Grandi, E., Pandit, S.V., Voigt, N., Workman, A.J., Dobrev, D., Jalife, J., Bers, D.M., 2011. Human atrial action potential and Ca²⁺ model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Circ. Res.* 109, 1055–1066. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253955
- Grikscheit, K., Thomas, N., Bruce, A.F., Rothery, S., Chan, J., Severs, N.J., Dupont, E., 2008a. Coexpression of Connexin45 with Connexin43 Decreases Gap Junction Size. *Cell Commun. Adhes.* 15, 185–193. doi:10.1080/15419060802013943
- Grikscheit, K., Thomas, N., Bruce, A.F., Rothery, S., Chan, J., Severs, N.J., Dupont, E., 2008b. Coexpression of connexin 45 with connexin 43 decreases gap junction size. *Cell Commun. Adhes.* 15, 185–193. doi:10.1080/15419060802013943
- Gros, D.B., Jongsma, H.J., 1996. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 18, 719–730. doi:10.1002/bies.950180907
- Gutstein, D.E., Liu, F.-Y., Meyers, M.B., Choo, A., Fishman, G.I., 2003. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J. Cell Sci.* 116, 875–885.

- Gutstein, D.E., Morley, G.E., Vaidya, D., Liu, F., Chen, F.L., Stuhlmann, H., Fishman, G.I., 2001. Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction 1194–1199.
- Halliday, D., Dupont, E., Coppen, S.R., Severs, N.J., 2003. Development of a cell model for functional and structural analysis of connexin co-expression: achieving homogeneous and inducible expression of multiple connexins in stable transfectants 311–317.
- Harris, A.L., 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap 325–472.
- He, D.S., Jiang, J.X., Taffet, S.M., Burt, J.M., 1999. Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells 6495–6500.
- Hennemann, H., Suchyna, T., Lichtenberg-Fraté, H., Jungbluth, S., Dahl, E., Schwarz, J., Nicholson, B.J., Willecke, K., 1992. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J. Cell Biol.* 117, 1299–1310.
- Hertlein, B., Butterweck, A., Haubrich, S., Willecke, K., Traub, O., 1998. Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* 162, 247–257.
- Hunter, A.W., Barker, R.J., Zhu, C., Gourdie, R.G., 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion 5686–5698.
- Hunter, A.W., Gourdie, R.G., 2008. The second PDZ domain of zonula occludens-1 is dispensable for targeting to connexin 43 gap junctions. *Cell Commun. Adhes.* 15, 55–63. doi:10.1080/15419060802014370
- Jansen, J.A., Noorman, M., Musa, H., Stein, M., de Jong, S., van der Nagel, R., Hund, T.J., Mohler, P.J., Vos, M.A., van Veen, T.A., de Bakker, J.M., Delmar, M., van Rijen, H.V., 2012. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice 600–607.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., Laird, D.W., 2001. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell Sci.* 114, 763–773.
- Kang, M., Lin, N., Li, C., Meng, Q., Zheng, Y., Yan, X., Deng, J., Ou, Y., Zhang, C., He, J., Luo, D., 2014. Cx43 phosphorylation on S279/282 and intercellular communication are regulated by IP3/IP3 receptor signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* 12, 58. doi:10.1186/s12964-014-0058-6
- Kato, T., Iwasaki, Y., Nattel, S., 2012. Connexins and Atrial Fibrillation Filling in the Gaps. *Circulation* 125, 125:203-206. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075432
- Kjenseth, A., Fykerud, T.A., Sirnes, S., Bruun, J., Yohannes, Z., Kolberg, M., Omori, Y., Rivedal, E., Leithe, E., 2012. The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. *J. Biol. Chem.* 287, 15851–15861. doi:10.1074/jbc.M111.281832
- Kléber, A.G., Janse, M.J., Fast, V.G., 2001. Normal and Abnormal Conduction in the Heart, Handbook of Physiology. Oxford University Press.
- Kopanic, J.L., Al-mugotir, M.H., Kieken, F., Zach, S., Trease, A.J., Sorgen, P.L., 2014. Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners. *Biophys. J.* 106, 2184–2195. doi:10.1016/j.bpj.2014.03.045
- Koval, M., Geist, S.T., Westphale, E.M., Kemendy, A.E., Civitelli, R., Beyers, E.C., Steinberg, T.H., 1995. Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. *J. Cell Biol.* 130, 987–995.
- Kreuzberg, M.M., Schrickel, J.W., Ghanem, A., Kim, J.-S., Degen, J., Janssen-Bienhold, U., Lewalter, T., Tiemann, K., Willecke, K., 2006. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5959–5964. doi:10.1073/pnas.0508512103
- Kreuzberg, M.M., Söhl, G., Kim, J.-S., Verselis, V.K., Willecke, K., Bukauskas, F.F., 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart 1169–1177.

- Krüger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., Willecke, K., 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice 4179–4193.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., Shibata, Y., 2000. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3501–3512.
- Kwon, T., Tang, Q., Bargiello, T.A., 2013. Voltage-dependent gating of the Cx32*43E1 hemichannel: conformational changes at the channel entrances 243–259.
- Laing, J.G., Beyer, E.C., 1995. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26399–26403.
- Laing, J.G., Tadros, P.N., Green, K., Saffitz, J.E., Beyer, E.C., 1998. Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 38, 711–718.
- Laird, D.W., Puranam, K.L., Revel, J.P., 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273(Pt 1), 67–72.
- Lampe, P.D., 1994. Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J. Cell Biol.* 127, 1895–1905.
- Lampe, P.D., TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., Lau, A.F., 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 149, 1503–1512.
- Leykauf, K., Salek, M., Bomke, J., Frech, M., Lehmann, W.-D., Dürst, M., Alonso, A., 2006. Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *J. Cell Sci.* 119, 3634–3642. doi:10.1242/jcs.03149
- Lin, X., Gemel, J., Glass, A., Zemlin, C.W., Beyer, E.C., Veenstra, R.D., 2010. Connexin40 and connexin43 determine gating properties of atrial gap junction channels 238–245.
- Lin, X., Veenstra, R.D., 2004. Action potential modulation of connexin40 gap junctional conductance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1726-1735. doi:10.1152/ajpheart.00943.2003
- Liu, F., Arce, F.T., Ramachandran, S., Lal, R., 2006. Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *J. Biol. Chem.* 281, 23207–23217. doi:10.1074/jbc.M605048200
- Martinez, A.D., Hayrapetyan, V., Moreno, A.P., Beyer, E.C., 2002. Connexin43 and Connexin45 Form Heteromeric Gap Junction Channels in Which Individual Components Determine Permeability and Regulation. *Circ. Res.* 90, 90: 1100-1107. doi:10.1161/01.RES.0000019580.64013.31
- McCain, M.L., Desplantez, T., Geisse, N.A., Rothen-Rutishauser, B., Oberer, H., Parker, K.K., Kleber, A.G., 2012a. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance H443-450.
- McCain, M.L., Desplantez, T., Geisse, N.A., Rothen-Rutishauser, B., Oberer, H., Parker, K.K., Kleber, A.G., 2012b. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H443-450. doi:10.1152/ajpheart.01218.2010
- Meraviglia, V., Azzimato, V., Colussi, C., Florio, M.C., Binda, A., Panariti, A., Qanud, K., Suffredini, S., Gennaccaro, L., Miragoli, M., Barbuti, A., Lampe, P.D., Gaetano, C., Pramstaller, P.P., Capogrossi, M.C., Recchia, F.A., Pompilio, G., Rivolta, I., Rossini, A., 2015. Acetylation mediates Cx43 reduction caused by electrical stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 54–64. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.08.001
- Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H.V.M., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J., Gros, D., 2004. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc. Res.* 63, 77–86. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.007
- Moreno, A.P., Chanson, M., Elenes, S., Anumonwo, J., Scerri, I., Gu, H., Taffet, S.M., Delmar, M., 2002. Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating 450–457.

- Moreno, A.P., Laing, J.G., Beyer, E.C., Spray, D.C., 1995. Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am. J. Physiol.* 268, C356-365.
- Musil, L.S., Goodenough, D.A., 1990. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 875–880.
- Nakagawa, S., Gong, X.-Q., Maeda, S., Dong, Y., Misumi, Y., Tsukihara, T., Bai, D., 2011. Asparagine 175 of connexin32 is a critical residue for docking and forming functional heterotypic gap junction channels with connexin26. *J. Biol. Chem.* 286, 19672–19681. doi:10.1074/jbc.M110.204958
- Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Krämer, K., Willecke, K., 2000. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 8), 1365–1372.
- Nishii, K., Kumai, M., Egashira, K., Miwa, T., Hashizume, K., Miyano, Y., Shibata, Y., 2003. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect 365–369.
- Oyamada, M., Takebe, K., Oyamada, Y., 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 118–133. doi:10.1016/j.bbame.2011.12.031
- Paul, M., Wichter, T., Gerss, J., Arps, V., Schulze-Bahr, E., Robenek, H., Breithardt, G., Weissen-Plenz, G., 2013. Connexin Expression Patterns in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 111, 1488–1495. doi:10.1016/j.amjcard.2013.01.299
- Polontchouk, L.O., Valiunas, V., Haefliger, J.-A., Eppenberger, H.M., Weingart, R., 2002. Expression and regulation of connexins in cultured ventricular myocytes isolated from adult rat hearts. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 443, 676–689. doi:10.1007/s00424-001-0747-z
- Purnick, P.E., Oh, S., Abrams, C.K., Verselis, V.K., Bargiello, T.A., 2000. Reversal of the gating polarity of gap junctions by negative charge substitutions in the N-terminus of connexin 32 2403–2415.
- Rackauskas, M., Kreuzberg, M.M., Pranevicius, M., Willecke, K., Verselis, V.K., Bukauskas, F.F., 2007. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45 1952–1965.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J., 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 1831–1834.
- Revilla, A., Castro, C., Barrio, L.C., 1999. Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin-32 and connexin-43 junctions 1374–1383.
- Rhett, J.M., Gourdie, R.G., 2012. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization 619–623.
- Rhett, J.M., Jourdan, J., Gourdie, R.G., 2011. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* 22, 1516–1528. doi:10.1091/mbc.E10-06-0548
- Rhett, J.M., Ongstad, E.L., Jourdan, J., Gourdie, R.G., 2012. Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus 411–422.
- Ri, Y., Ballesteros, J.A., Abrams, C.K., Oh, S., Verselis, V.K., Weinstein, H., Bargiello, T.A., 1999. The role of a conserved proline residue in mediating conformational changes associated with voltage gating of Cx32 gap junctions 2887–2898.
- Rivedal, E., Leithe, E., 2005. Connexin43 synthesis, phosphorylation, and degradation in regulation of transient inhibition of gap junction intercellular communication by the phorbol ester TPA in rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 302, 143–152. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.004
- Rossi, S., Baruffi, S., Bertuzzi, A., Miragoli, M., Corradi, D., Maestri, R., Alinovi, R., Mutti, A., Musso, E., Sgoifo, A., Brisinda, D., Fenici, R., Macchi, E., 2008. Ventricular activation is impaired in aged rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H2336-2347. doi:10.1152/ajpheart.00517.2008

- Seki, A., Duffy, H.S., Coombs, W., Spray, D.C., Taffet, S.M., Delmar, M., 2004. Modifications in the biophysical properties of connexin43 channels by a peptide of the cytoplasmic loop region. *Circ. Res.* 95, e22-28. doi:10.1161/01.RES.0000140737.62245.c5
- Severs, N.J., Bruce, A.F., Dupont, E., Rothery, S., 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc. Res.* 80, 9–19. doi:10.1093/cvr/cvn133
- Shaw, R.M., Fay, A.J., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Jan, Y.-N., Jan, L.Y., 2007. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 128, 547–560. doi:10.1016/j.cell.2006.12.037
- Shibayama, J., Gutiérrez, C., González, D., Kieken, F., Seki, A., Carrión, J.R., Sorgen, P.L., Taffet, S.M., Barrio, L.C., Delmar, M., 2006. Effect of charge substitutions at residue his-142 on voltage gating of connexin43 channels 4054–4063.
- Smith, T.D., Mohankumar, A., Minogue, P.J., Beyer, E.C., Berthoud, V.M., Koval, M., 2012. Cytoplasmic amino acids within the membrane interface region influence connexin oligomerization. *J. Membr. Biol.* 245, 221–230. doi:10.1007/s00232-012-9443-5
- Söhl, G., Degen, J., Teubner, B., Willecke, K., 1998. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 428, 27–31.
- Söhl, G., Nielsen, P.A., Eiberger, J., Willecke, K., 2003. Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues 27–36.
- Söhl, G., Willecke, K., 2004. Gap junctions and the connexin protein family 228–232.
- Solan, J.L., Lampe, P.D., 2016. Kinase programs spatiotemporally regulate gap junction assembly and disassembly: Effects on wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 40–48. doi:10.1016/j.semcdb.2015.12.010
- Stergiopoulos, K., Alvarado, J.L., Mastroianni, M., Ek-Vitorin, J.F., Taffet, S.M., Delmar, M., 1999. Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ. Res.* 84, 1144–1155.
- Tang, Q., Dowd, T.L., Verselis, V.K., Bargiello, T.A., 2009. Conformational changes in a pore-forming region underlie voltage-dependent “loop gating” of an unapposed connexin hemichannel 555–570.
- Trexler, E.B., Bennett, M.V., Bargiello, T.A., Verselis, V.K., 1996. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5836–5841.
- Valiunas, V., Bukauskas, F.F., Weingart, R., 1997. Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells 708–719.
- Valiunas, V., Gemel, J., Brink, P.R., Beyer, E.C., 2001. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43 H1675-1689.
- Valiunas, V., Manthey, D., Vogel, R., Willecke, K., Weingart, R., 1999. Biophysical properties of mouse connexin30 gap junction channels studied in transfected human HeLa cells 631–644.
- Valiunas, V., Vogel, R., Weingart, R., 2000. The kinetics of gap junction currents are sensitive to the ionic composition of the pipette solution. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 440, 835–842.
- Valiunas, V., Weingart, R., Brink, P.R., 2000a. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43 E42-49.
- Valiunas, V., Weingart, R., Brink, P.R., 2000b. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Circ. Res.* 86, E42-49.
- van Rijen, H.V., van Veen, T.A., Hermans, M.M., Jongsma, H.J., 2000. Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc. Res.* 45, 941–951.
- Van Rijen, H.V., Wilders, R., Van Ginneken, A.C., Jongsma, H.J., 1998. Quantitative analysis of dual whole-cell voltage-clamp determination of gap junctional conductance 141–151.
- van Veen, T.A., van Rijen, H.V., Jongsma, H.J., 2000. Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 46, 496–510.

- Veenstra, R.D., 2001. Voltage clamp limitations of dual whole-cell gap junction current and voltage recordings. I. Conductance measurements. *Biophys. J.* 80, 2231–2247. doi:10.1016/S0006-3495(01)76196-6
- Vozzi, C., Dupont, E., Coppen, S.R., Yeh, H.I., Severs, N.J., 1999. Chamber-related differences in connexin expression in the human heart 991–1003.
- Wang, X., Li, L., Peracchia, L.L., Peracchia, C., 1996. Chimeric evidence for a role of the connexin cytoplasmic loop in gap junction channel gating. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 431, 844–852.
- Werner, R., 2000. IRES elements in connexin genes: a hypothesis explaining the need for connexins to be regulated at the translational level. *IUBMB Life* 50, 173–176. doi:10.1080/152165400300001480
- Whitaker, G.M., Angoli, D., Nazzari, H., Shigemoto, R., Accili, E.A., 2007. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* 282, 22900–22909. doi:10.1074/jbc.M610978200
- Yang, Y.-Q., Liu, X., Zhang, X.-L., Wang, X.-H., Tan, H.-W., Shi, H.-F., Jiang, W.-F., Fang, W.-Y., 2010. Novel connexin40 missense mutations in patients with familial atrial fibrillation. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 12, 1421–1427. doi:10.1093/europace/euq274
- Zeng, Z., Zhang, H., Lin, N., Kang, M., Zheng, Y., Li, C., Xu, P., Wu, Y., Luo, D., 2014. Role of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in the regulation of calcium transients in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 37–46.
- Zimmer, T., Haufe, V., Blechschmidt, S., 2014. Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014, 449–463. doi:10.5339/gcsp.2014.58

b) Diminution d'expression de la Cx43

Cette étude a été réalisée sur des cellules Ni et Cx43:Cx45=1 d'une part sur des cellules contrôle non transfectées et d'autre part sur des cellules transfectées avec l'ARNi anti-Cx43.

i. Couplage électrique

Le couplage électrique intercellulaire est étudié pour un $V_j=+10\text{mV}$ pour lequel il est admis une absence de désactivation des canaux de jonction. Ceci s'illustre par des courants de jonction (I_j) ayant un décours constant durant la stimulation, observé dans toutes nos conditions expérimentales (Figure 51 A).

Nous avons observé que la diminution d'expression de la Cx43 diminue l'amplitude du couplage électrique intercellulaire caractérisée par des conductances de couplage $G_{j,0}$ spécifiques à chaque condition d'induction : $G_{j,0}=62\pm 5\text{nS}$ en condition Ni contrôle et $G_{j,0}=36\pm 8\text{nS}$ en présence d'ARNi anti-Cx43.

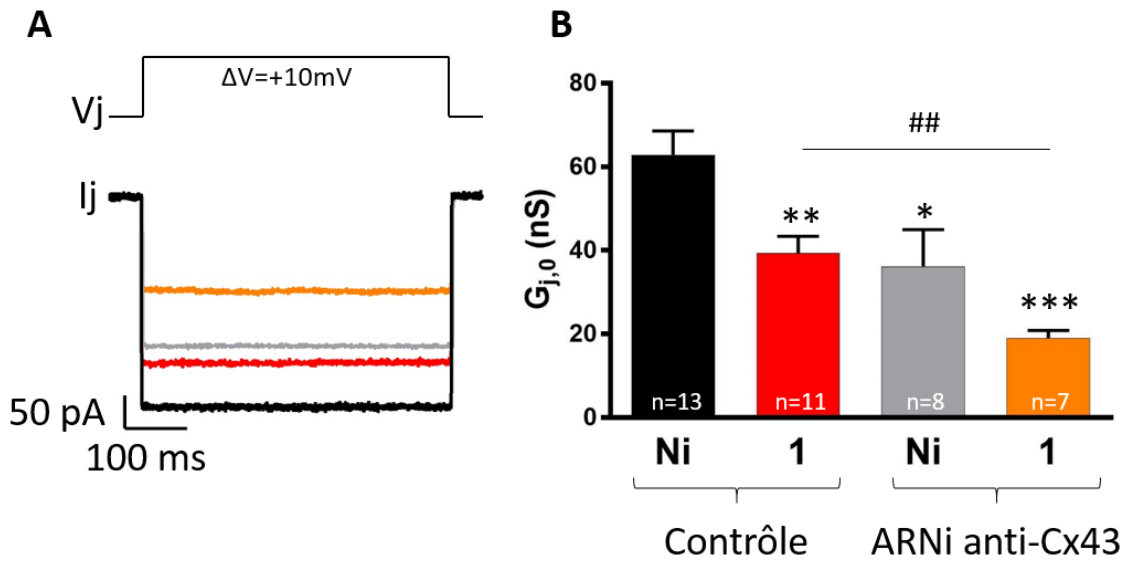


Figure 51 : Couplage électrique intercellulaire. **A** : exemple de I_j . **B** : histogramme des moyennes des couplages. * : t-test entre Ni contrôle et les autres conditions ; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$. ## : t-test entre Cx43:Cx45=1 contrôle et transfectées avec l'ARNi anti-Cx43 ; $p < 0.01$. Noir : Ni contrôle ; rouge : Cx43:Cx45=1 contrôle ; gris : Ni ARNi anti-Cx43 ; orange : Cx43:Cx45=1 ARNi anti-Cx43. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

De même, pour le ratio Cx43:Cx45=1 sont observés un $G_{j,0} = 43 \pm 3 \text{ nS}$ en condition contrôle et un $G_{j,0} = 19 \pm 2 \text{ nS}$ en présence d'ARNi anti-Cx43 (Figure 51 B).

Nous avons calculé le rapport des conductances $G_{j,0(\text{contrôle})}/G_{j,0(\text{ARNi anti-Cx43})}$ et observé un rapport de 0,6 pour la condition Ni et de 0,4 pour la condition Cx43:Cx45=1 montrant une diminution du couplage plus importante dans la condition de co-expression Cx43 et Cx45. De plus, le nombre de canaux de jonctions fonctionnels estimés par $n = G_{j,0}/\gamma_m$ donne pour la condition Ni avec ARNi anti-Cx43 $n = 620$ (contre $n = 1033$ pour la condition Ni contrôle) et pour la condition Cx43:Cx45=1 avec ARNi anti-Cx43 $n = 395$ (contre $n = 852$ pour la condition Cx43:Cx45=1 contrôle).

ii. Dépendance au potentiel de jonction

1. Cellules Ni

Les courants de jonctions (I_j) montrent une diminution de leurs amplitudes au cours du temps, dépendante de l'amplitude du potentiel de jonction et symétrique par rapport à un potentiel de jonction nul (Figure 52 A et B). Ce décours est similaire en condition contrôle et avec ARNi anti-Cx43. Nous avons caractérisé une dépendance au potentiel de jonction symétrique par rapport à $V_j=0mV$ (Figure 52 C) dont les paramètres de Boltzmann sont similaires entre la condition contrôle et la condition avec ARNi anti-Cx43 (Tableau 4) indiquent que seule la Cx43 est exprimée et forme des canaux homotypiques Cx43 dans les conditions contrôle et avec ARNi anti-Cx43.

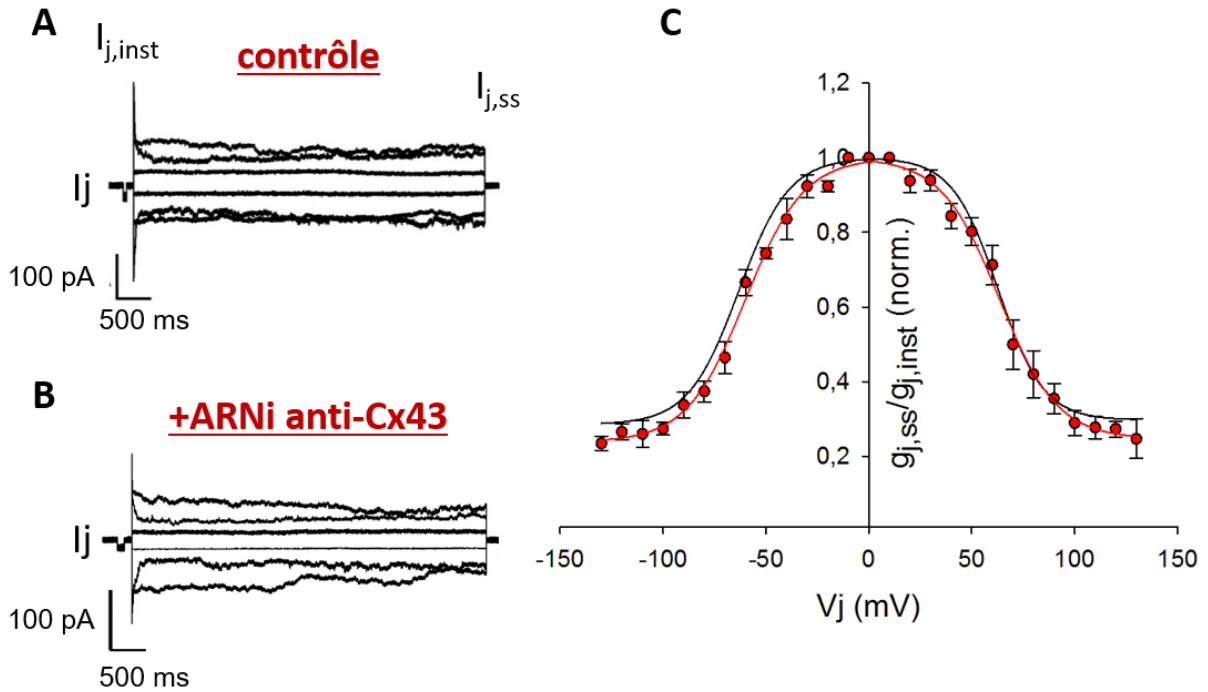


Figure 52 : Courants de jonctions pour les conditions Ni contrôle (A, $n=10$) et en présence d'ARNi anti-Cx43 (B, $n=6$). (C) Dépendance au potentiel de jonction la condition contrôle (noir) et la condition avec ARNi anti-Cx43 (rouge). Les courbes représentent la régression selon l'équation de Boltzmann pour chaque condition. Dans un souci de clarté les points de la condition contrôle ont été omis. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

2. Co-expression Cx43:Cx45=1

De manière similaire à la condition Ni, les courants de jonction de la condition Cx43:Cx45=1 présentent un décours dans le temps et en fonction de l'amplitude du potentiel de jonction symétrique par rapport à un potentiel de jonction nul. Ceci est observé pour les conditions contrôle et suite à la transfection avec l'ARNi anti-Cx43 (Figure 53 A et B). Les dépendances au potentiel de jonction des canaux de jonction des conditions contrôle et transfectées par ARNi anti-Cx43 sont similaires (Figure 53 C) caractérisées par des paramètres de Boltzmann similaires (Tableau 4).

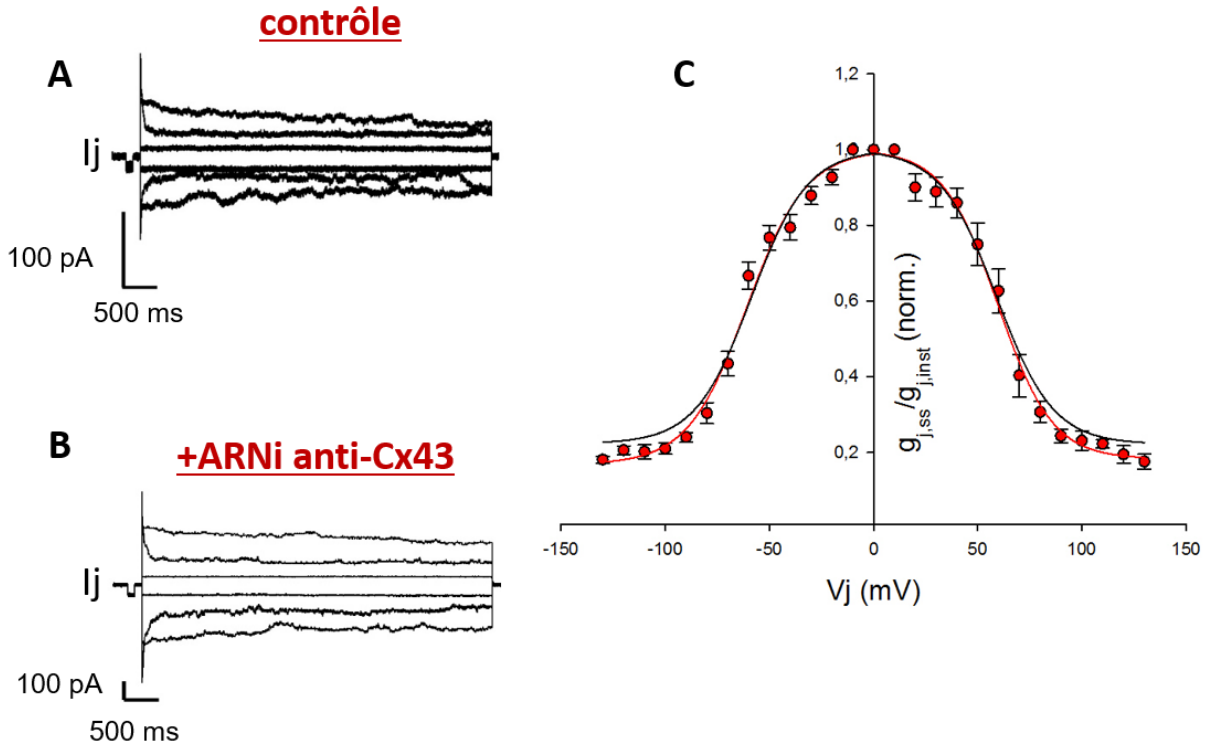


Figure 53 : Courants de jonctions pour les conditions Cx43:Cx45=1 contrôle (A, n=11) et en présence d'ARNi anti-Cx43 (B, n=9). (C) Dépendance au potentiel de jonction pour la condition contrôle (noir) et avec ARNi anti-Cx43 (rouge). Les courbes représentent la régression selon l'équation de Boltzmann. Dans un souci de clarté les points de la condition contrôle ont été omis. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

Ratios Cx43:Cx45	Vj,0 (mV)	gj,min (normalisé)	z (u.a.)
contrôle			
Ni	-63±1/63±1	0.3±0.1/0.3±0.1	2.1±0.1/2.1±0.2
1	-59±1/59±1	0.2±0.1/0.2±0.1	1.9±0.1/1.9±0.1
ARNi anti-Cx43			
Ni	-60±1/63±1	0.2±0.2/0.2±0.1	1.9±0.1/1.8±0.1
1	-61±2/60±1	0.1±0.1/0.2±0.1	1.9±0.2/2.0±0.2

Tableau 4 : Paramètres de Boltzmann. Vj,0 : potentiel de jonction de demi-désactivation maximale; gj,min : conductance de jonction minimale pour de larges potentiels de jonction ; z : nombre de charges positives q passant par les canaux de jonction. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

iii. Cinétiques de désactivation

Les courants de jonction présentent une diminution d'amplitude en fonction du potentiel de jonction qui suit une régression mono-exponentielle pour des potentiels de jonction inférieurs à $\pm 100\text{mV}$ et bi-exponentielle pour des potentiels de jonction supérieurs à $\pm 100\text{mV}$ (Figure 54 A et B). Ceci est caractérisé par une ou deux constantes de temps : rapide ($\tau_{d,1}$) et lente ($\tau_{d,2}$). Nous avons principalement analysé la constante de désactivation rapide en fonction de l'amplitude du potentiel de jonction. $\tau_{d,1}$ présente une dépendance au potentiel de jonction : plus l'amplitude de V_j est grande, plus $\tau_{d,1}$ est faible (Figure 54 C et D). Ceci indique une augmentation de la cinétique de fermeture des canaux de jonctions avec l'augmentation de l'amplitude du potentiel de jonction. De plus, aucune différence significative n'est observée entre les conditions contrôle et avec ARNi anti-Cx43 pour les conditions Ni et Cx43:Cx45=1 (Figure 54 C et D).

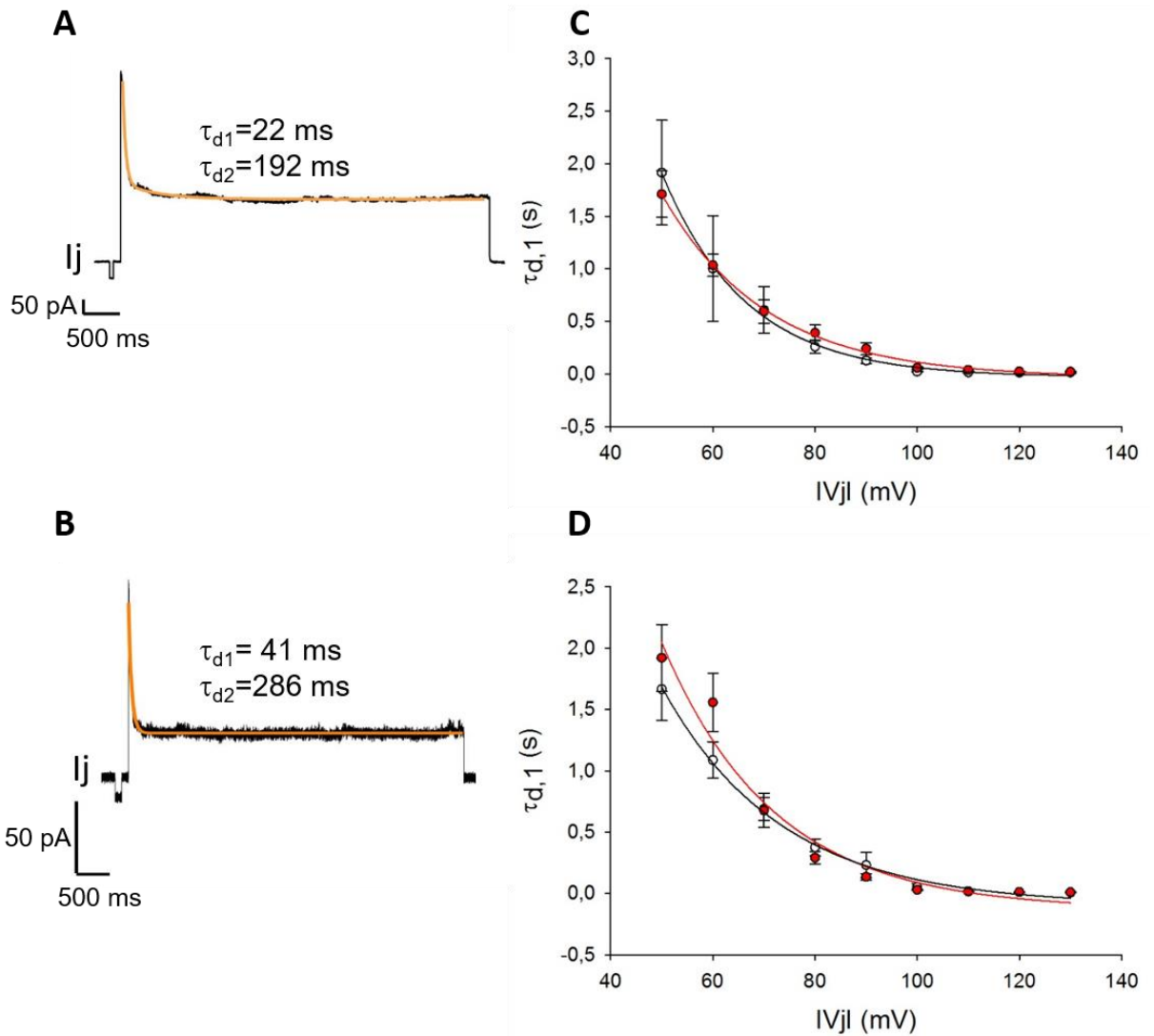


Figure 54 : Cinétiques de désactivation pour la condition contrôle et avec l'ARNi anti-Cx43. Exemple de régression bi-exponentielle (ligne orange) pour les conditions Ni (A) et Cx43:Cx45=1 (B) pour $V_j = -120 \text{ mV}$. $\tau_{d,1}$ en fonction du V_j pour les conditions Ni (C, contrôle : noir, $n=8$; ARNi anti-Cx43 : rouge, $n=4$) et Cx43:Cx45=1 (D, contrôle : noir, $n=8$; ARNi anti-Cx43 : rouge, $n=5$). (Dupuis S et al., 2016, non publié).

iv. Cinétiques de restitution

Les cinétiques de restitution correspondent au temps que les canaux de jonction mettent pour retrouver une conductance maximale après une désactivation (cf introduction et matériels et méthodes).

Afin de déterminer ces cinétiques nous avons calculé les conductances de jonction après différents degrés de désactivation : nulle avec $V_j = \pm 10\text{mV}$, intermédiaire avec $V_j = \pm 60\text{mV}$ et maximale avec $V_j = \pm 120\text{mV}$.

1. Cellules Ni

Potentiel de jonction $\pm 10\text{mV}$

A $V_j = \pm 10\text{mV}$, aucune désactivation n'est observée en condition contrôle et avec ARNi anti-Cx43. (Figure 55 A et D). L'absence de désactivation entraîne une absence de restitution qui se traduit par un ratio des conductances constant : $g_{p2}/g_{p1} = 1$.

Potentiel de jonction $\pm 60\text{mV}$

A $V_j = \pm 60\text{mV}$, nous avons observé que la restitution dépend du niveau d'expression de la Cx43. Pour les cellules contrôle, $g_{p2}/g_{p1} = 1$ est atteint à $t \approx 10\text{s}$. En présence d'ARNi anti-Cx43, la restitution est incomplète et atteint un état stable $g_{p2}/g_{p1} \approx 0,8$ à $t \approx 400\text{ms}$ (Figure 55 B et E).

Potentiel de jonction $\pm 120\text{mV}$

A $V_j = \pm 120\text{mV}$ la restitution des canaux de jonction en condition contrôle est maximale ($g_{p2}/g_{p1} = 1$) à $t \approx 2\text{s}$. En présence d'ARNi anti-Cx43, une conductance de jonction stable de $g_{p2}/g_{p1} \approx 1,15$ est observée, atteinte à $t \approx 2\text{s}$ (Figure 55 C et F).

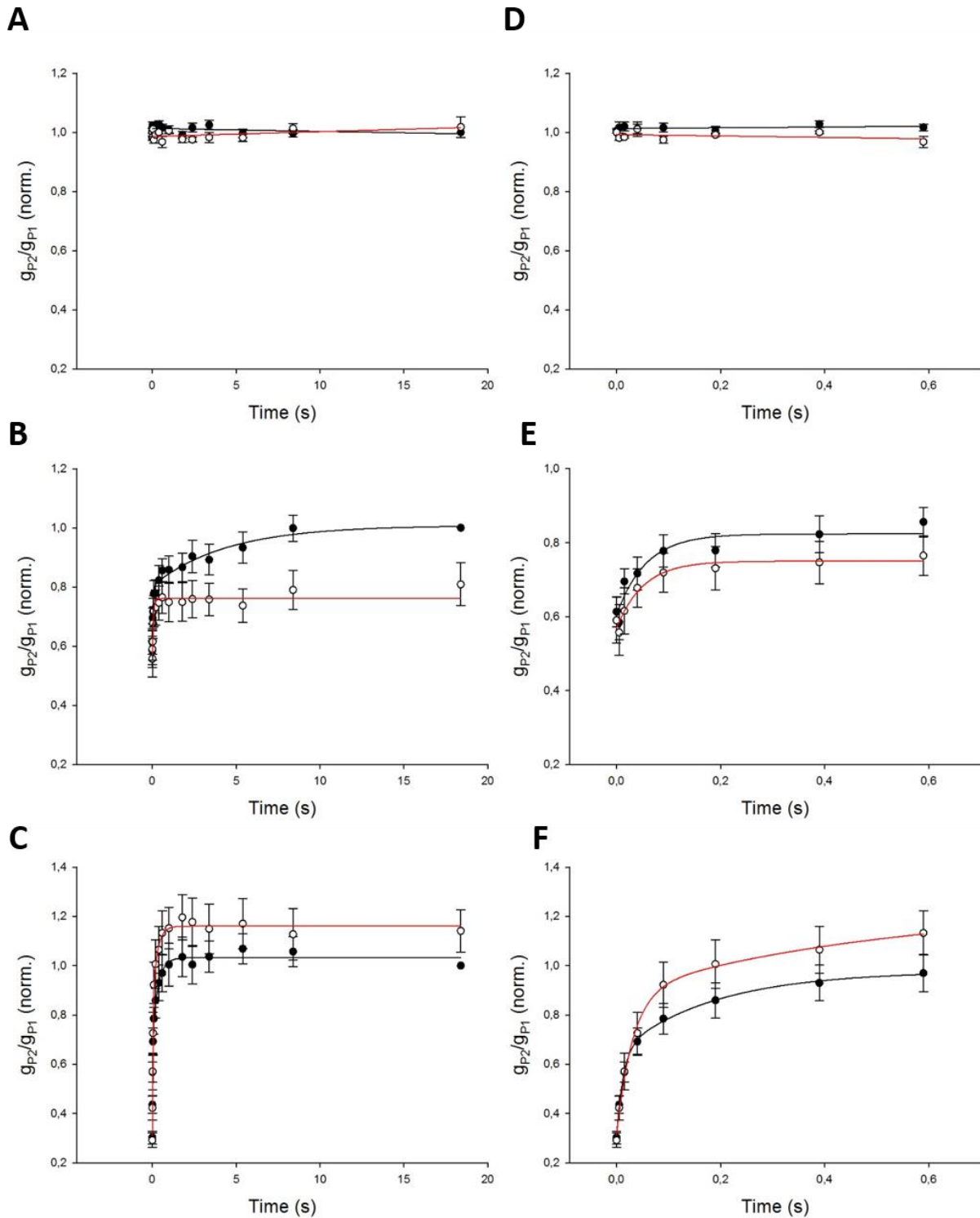


Figure 55 : Rapport g_{P2}/g_{P1} en fonction du temps total après désactivation pour la condition Ni en fonction du temps total après désactivation (A - C) et zoom à 700ms (D - F) pour des $V_j = \pm 10mV$ (A et D), $V_j = \pm 60mV$ (B et E) et $V_j = \pm 120mV$ (C et F). Les courbes noir représentent la condition contrôle et les courbes rouges représentent la condition avec ARNi anti-Cx43. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

2. Cellules Cx43:Cx45=1

Potentiel de jonction $\pm 10\text{mV}$

De manière similaire à la condition Ni, les canaux de jonction en condition Cx43:Cx45=1 ne se désactivent pas à $\pm 10\text{mV}$. Il en résulte un rapport constant $g_{p2}/g_{p1}=1$ (Figure 56 A et D).

Potentiel de jonction $\pm 60\text{mV}$

Pour un $V_j \pm 60\text{mV}$, les cinétiques de restitution dépendent du niveau d'expression de la Cx43. En effet, un état stable maximum $g_{p2}/g_{p1} \approx 0.8$ reflétant une restitution incomplète est atteinte à $t \approx 10\text{s}$ pour la condition sans ARNi anti-Cx43 et un maximum de $g_{p2}/g_{p1} \approx 0.9$ est atteint à $t \approx 10\text{s}$ pour la condition avec ARNi anti-Cx43 (Figure 56 B et E).

Potentiel de jonction $\pm 120\text{mV}$

A $V_j = \pm 120\text{mV}$ la restitution en condition sans ARNi anti-Cx43 atteint une conductance maximale de $g_{p2}/g_{p1} \approx 0.9$ à $t \approx 1\text{s}$. La restitution de la condition avec ARNi anti-Cx43 atteint son maximum $g_{p2}/g_{p1} \approx 0.95$ à $t \approx 5\text{s}$ (Figure 56 C et F).

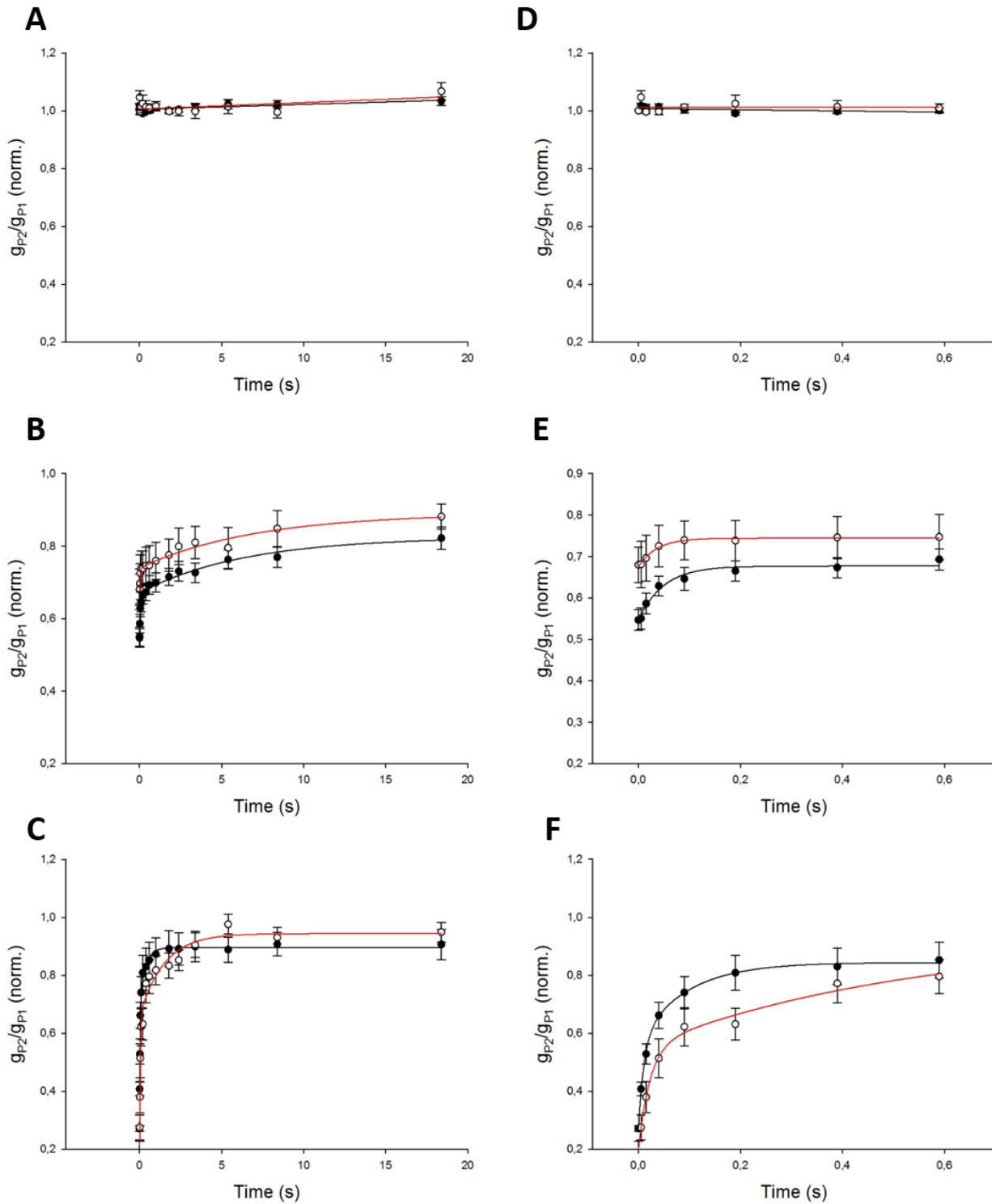


Figure 56 : Rapport g_{P2}/g_{P1} en fonction du temps total après désactivation pour la condition Cx43:Cx45=1 en fonction du temps total après désactivation (A - C) et zoom à 700ms (D - F) pour des $V_j = \pm 10\text{mV}$ (A et D), $V_j = \pm 60\text{mV}$ (B et E) et $V_j = \pm 120\text{mV}$ (C et F). Les courbes noires représentent la condition contrôle et les courbes rouges représentent la condition avec ARNi anti-Cx43. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

v. Conductances unitaires

1. Cellules Ni

Dans les conditions Ni contrôle et avec ARNi anti-Cx43 trois états unitaires caractéristiques des canaux de jonction sont observés : un état principal, un état résiduel et un état fermé (Figure 57 A et B). Les courants de jonction mesurés et leurs conductances respectives présentent des valeurs similaires pour des polarités positives et négatives du potentiel de jonction suggérant la présence de canaux de jonction formés de Cx43 similaire à ceux observés dans notre étude Dupuis et al 2016 pour la condition Ni. Les fréquences de distribution des conductances unitaires montrent dans les deux conditions un état principal à $\gamma_m \approx 60\text{pS}$ et un état résiduel à $\gamma_r \approx 20\text{pS}$

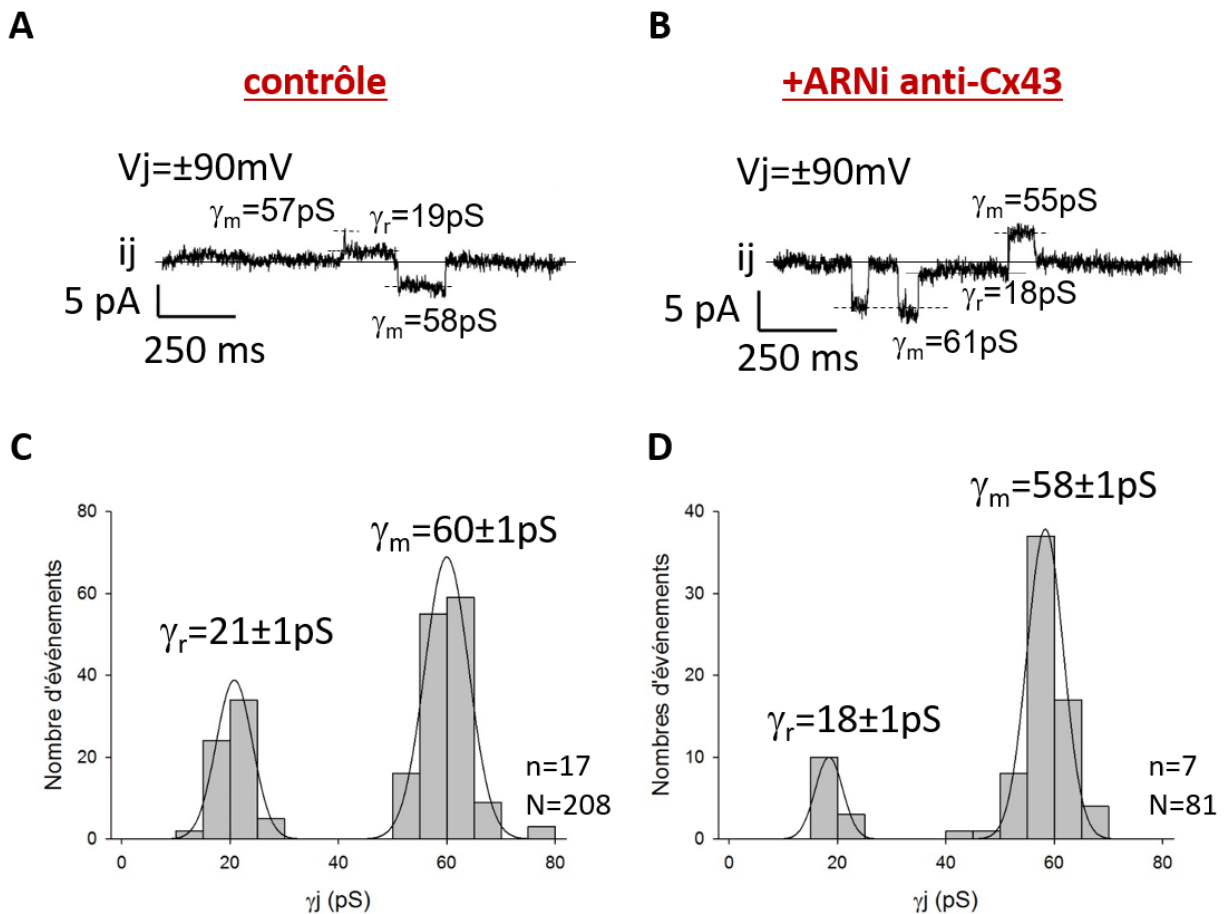


Figure 57 : Conductances unitaires des canaux de jonction en condition Ni contrôle (A et C) et après transfection avec ARNi anti-Cx43 (B et D). Exemples de courants unitaires en condition contrôle (A) et avec ARNi anti-Cx43 (B). Fréquences de distribution des conductances unitaires en condition contrôle (C) et après transfection avec ARNi anti-Cx43 (D). n = nombre de paires de cellule, N = nombre d'événements unitaires observés. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

(Figure 57 C et D) caractéristiques des canaux de jonctions homotypiques Cx43 (Desplantez et al 2011).

2. Cellules Cx43:Cx45=1

Dans cette condition nous avons également observé deux états ouverts et un état fermé (Figure 58 A et C) des canaux de jonction caractérisés par des valeurs similaires de courants de jonction en fonction de la polarité du potentiel de jonction suggérant la formation de canaux de jonction composés de demi-canaux identiques. Les fréquences de distribution des conductances unitaires montrent dans les deux conditions un état principal à $\gamma_m \approx 50\text{pS}$ et un état résiduel à $\gamma_r \approx 13\text{pS}$

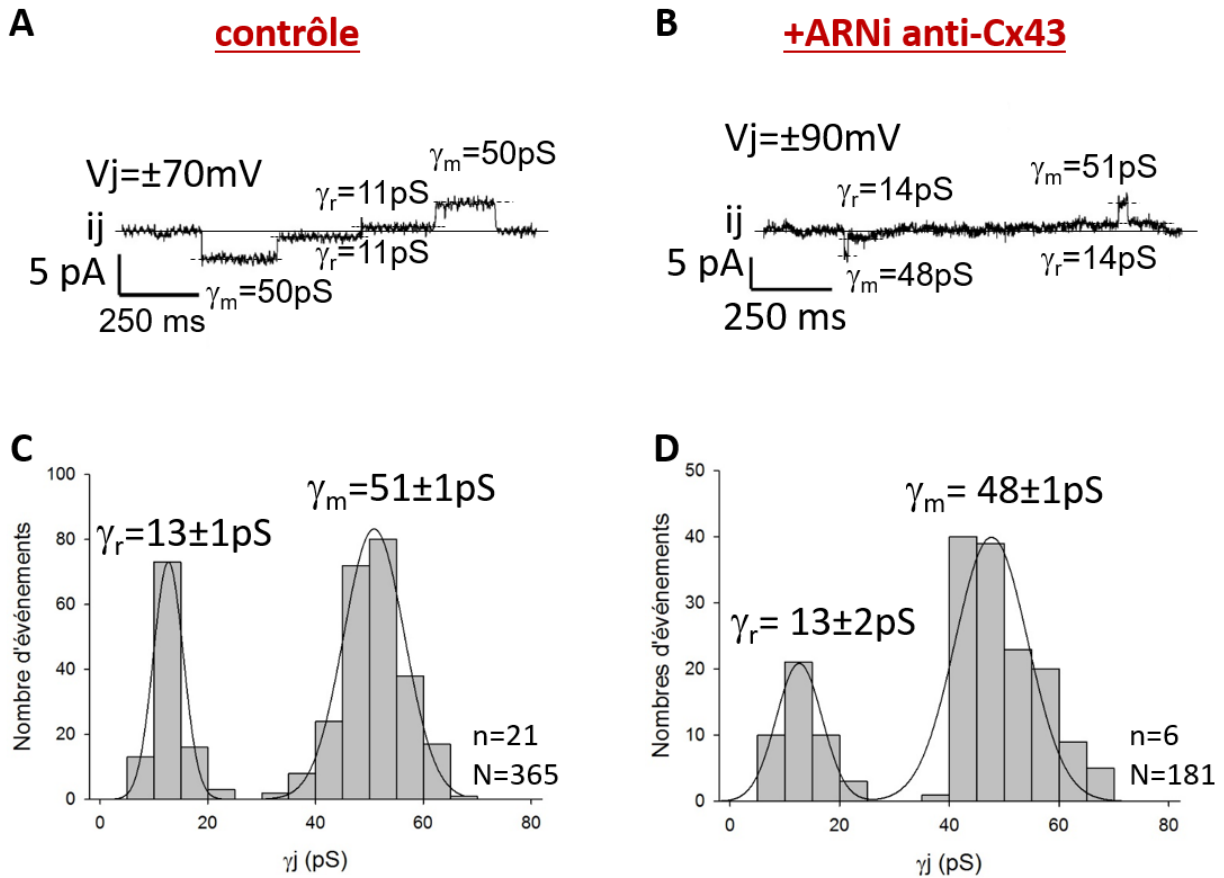


Figure 58 : Conductances unitaires des canaux de jonction Cx43:Cx45=1 pour la condition contrôle (A et C) et pour la condition avec ARNi anti-Cx43 (B et D). Exemples de courants unitaires de la condition contrôle (A) et de la condition avec ARNi anti-Cx43 (B). Fréquences de distribution des conductances unitaires de la condition contrôle (C) et de la condition avec ARNi anti-Cx43 (D). n = nombre de paires de cellule, N = nombre de conductances unitaires. (Dupuis S et al., 2016, non publié).

(Figure 58 C et D). Ceci suggère la formation de canaux de jonction mixtes similaires à ceux observés dans notre étude Dupuis et al 2016 dans la condition Cx43:Cx45=1. Les analyses préliminaires montrent une majorité de canaux de jonction hétéromériques composés de Cx43 et de Cx45 en présence et en absence d'ARNi anti-Cx43. Une proportion d'environ 10% de canaux de jonction homotypiques Cx43 est observé mais aucun canal homotypique Cx45 n'a été observé. Ceci suggère que la diminution du niveau d'expression de la Cx43 ne modifie pas sa contribution dans la formation des canaux de jonction mais leur densité (cf conclusion et discussion).

Conclusions et discussions

Les études précédentes ont montré que des canaux de jonctions homotypiques, hétérotypiques et hétéromériques peuvent être formés dans des lignées cellulaires (Desplantez et al., 2015, 2007, 2004; Martinez et al., 2002; Valiunas et al., 2001) ou dans des myocytes primaires (Beauchamp, 2004; Beauchamp et al., 2012a; Lin et al., 2010). De plus, des modifications des niveaux d'expressions des connexines peuvent avoir lieu en conditions physiologiques ou pathologiques modifiant les ratios de co-expressions des connexines. Ceci modifie la formation des canaux de jonction dont les propriétés électriques seront différentes.

Dans mon étude de thèse nous nous sommes intéressés à la formation et aux propriétés électriques des canaux de jonction en fonction dans différentes conditions de co-expression (induction de l'expression de Cx45 et diminution de l'expression de Cx43). Cette étude a pour but de déterminer s'il existe un seuil pour lequel un ratio de co-expression est physiologique ou pathologique.

Ce chapitre résume et discute des principales observations de mes travaux et complètent certains travaux antérieurs (Desplantez et al 2004, 2011).

I/ Résumé de mes travaux

a) Caractérisation biochimique

Dans un premier temps, nous avons contrôlé le fonctionnement du système d'expression inductible. Nous avons observé, par westerns blots et immunofluorescence une expression unique de Cx43 endogène et aucune expression de Cx45 dans les cellules Ni. Par contre, la Cx45 est observée lors de l'induction par l'inducteur (la ponastérone A) à des niveaux d'expressions qui dépendent de la concentration en ponastérone A (Desplantez et al., 2015; Grikscheit et al., 2008; Halliday et al., 2003).

De plus, une augmentation non significative de l'expression de Cx43 lors d'une co-expression avec Cx45 a été observée, comme précédemment caractérisé dans l'étude Desplantez et al., 2015. Enfin, suite à la transfection avec ARNi anti-Cx43 une diminution de l'expression de Cx43 a été observée dans les conditions étudiés (Ni et Cx43:Cx45=1).

De plus, lors des co-expressions, les immunofluorescences montrent une co-localisation des Cx43 et Cx45 au niveau des membranes plasmiques des cellules. Cela suggère la formation de canaux composés de Cx43 et Cx45 ou composés uniquement de Cx43 ou de Cx45. Afin de déterminer quels sont les canaux de jonctions contribuant au couplage électrique qui sont formés lors des co-expressions, nous avons étudié leurs propriétés électriques.

b) Caractérisation fonctionnelle

i. Aucune induction d'expression de Cx45 : Ni

Les propriétés électriques (couplage électrique, dépendance au potentiel de jonction, cinétiques de désactivation et conductances unitaires) observées dans cette condition sont identiques à celles des canaux de jonctions homotypiques composés de Cx43 (Desplantez et al., 2011) et permet de confirmer que notre modèle d'expression dans la lignée RLE ind45 n'exprime pas la Cx45 en absence d'induction par la ponastérone A.

ii. Induction d'expression de Cx45

L'induction de la Cx45 diminue le couplage électrique et augmente la dépendance au potentiel de jonction indépendamment du ratio Cx43 :Cx45 dans toutes les conditions de co-expressions et par rapport à une expression de la Cx43 seule.

Par contre, nous observons des cinétiques de désactivation accélérées, similaires et ralenties par rapport à la Cx43 seule pour les ratios Cx43:Cx45=5.8, 2.3 et 1 respectivement, caractérisées par : plus le niveau d'expression de Cx45 augmente, plus les cinétiques de désactivations sont ralenties.

Les cinétiques de restitution montrent une dépendance à l'amplitude du potentiel de jonction : plus l'amplitude du potentiel de jonction est importante, plus les cinétiques de restitution sont rapides. Nous observons également une accélération des cinétiques de restitution avec l'induction de Cx45.

Les conductances unitaires reflètent une formation de canaux de jonctions composés de Cx43 et de Cx45 pour chaque niveau d'induction d'expression de Cx45. Les conductances unitaires des conditions de co-expressions sont plus proches des conductances unitaires des canaux homotypiques Cx43 que des canaux homotypiques Cx45 suggérant une composition en majorité de Cx43.

De façon importante, notre approche électrophysiologique permet de montrer que les canaux de jonction hétéromériques contribuent en majorité aux propriétés électriques malgré une faible formation (<10% de la quantité totale des connexines, Desplantez et al 2015).

iii. Diminution d'expression de Cx43 : ARNi anti-Cx43

1. Condition Ni

Pour la condition Ni, les propriétés électriques des canaux de jonction sont similaires à celles observées en absence d'ARNi anti-Cx43. Seule l'amplitude du couplage électrique est diminuée qui indique la présence unique de canaux homotypiques Cx43 mais à moindre densité.

2. Induction d'expression de Cx45 : condition Cx43:Cx45=1

Nous observons dans ce cas une diminution de l'amplitude du couplage électrique par rapport à la condition Cx43:Cx45=1 en absence d'ARNi anti-Cx43. La dépendance au potentiel de jonction et les cinétiques de désactivation ne sont pas modifiée par la diminution du niveau d'expression de la Cx43. Au contraire, les cinétiques de restitution sont accélérées avec la diminution du niveau d'expression de Cx43. Les conductances unitaires montrent que les canaux de jonctions formés sont similaires à ceux de la condition Cx43:Cx45=1. Cela suggère que la diminution du niveau d'expression de Cx43 ne modifie pas la composition des canaux de jonction formés mais réduit leur densité jonctionnelle. Malgré cela, une étude plus approfondi des cinétiques de restitution reste à réaliser afin de comprendre d'où proviennent les différences observées.

II/ Discussion

Ces travaux sont corrélés à la caractérisation biochimique de la co-expression de Cx43 avec Cx45 (Desplantez et al., 2015). Cette étude montre que des canaux hétéromériques sont formés en minorité tandis que notre étude montre qu'ils contribuent en majorité aux propriétés électriques. Dans cette partie nous allons discuter des résultats obtenues dans nos études.

a) Couplage électrique

1. Induction d'expression de Cx45

Nos travaux montrent que l'induction d'une expression de la Cx45 avec Cx43 diminue le couplage électrique de manière indépendante du ratio de co-expression (Desplantez et al., 2015). Ceci peut s'expliquer par la diminution des conductances unitaires des canaux de jonction formés que nous observons, aussi conjuguée à une diminution de la taille des jonctions communicantes (Grikscheit et al., 2008) qui diminuerait le nombre de canaux de jonction fonctionnels.

2. ARNi anti-Cx43

La diminution de l'expression de Cx43 diminue le couplage électrique suggérant une diminution de la densité de canaux de jonctions fonctionnels. Ceci a été caractérisé par une diminution du nombre de canaux de jonctions après transfection par ARNi anti-Cx43 (cf. résultats).

b) Dépendance au potentiel de jonction

1. Induction d'expression de Cx45

La dépendance au potentiel de jonction des canaux de jonctions lors de l'induction de la Cx45 est augmentée par rapport à l'expression unique de la Cx43 de manière indépendante du ratio de co-expression et est intermédiaire aux dépendances des canaux de jonction homotypiques Cx43 et

Cx45 (Desplantez et al., 2004). Ceci reflète soit une formation de canaux de jonction hétéromériques composés de Cx43 et de Cx45 soit une faible contribution des canaux homotypiques Cx45 qui possèdent une dépendance au potentiel de jonction plus prononcée que les canaux homotypiques Cx43 (Desplantez et al., 2004). De plus, nous observons une dépendance au potentiel de jonction symétrique par rapport à un potentiel nul qui suggère une composition en connexine homogène des canaux dans chaque cellule. De plus, à moins d'une disposition symétrique des demi-canaux homomériques Cx43 et Cx45 et un assemblage préférentiel entre les cellules adjacentes, cela indique que les canaux hétérotypiques ayant une dépendance au potentiel de jonction asymétrique (Desplantez et al., 2004) ne contribuent pas ou très faiblement au couplage électrique. La composition des canaux de jonctions a été étudiée de manière approfondie grâce à nos enregistrements unitaires.

2. ARNi anti-Cx43

La diminution du niveau d'expression de Cx43 ne modifie pas la dépendance au potentiel de jonction par rapport aux conditions sans ARNi anti-Cx43. Nos enregistrements unitaires complémentaires indiquent que la diminution d'expression de Cx43 induit la formation de canaux de composition similaire à celle sans transfection avec SiRNA. Cette régulation fine de la formation des canaux indique une indépendance au niveau de Cx43 et probablement un rôle déterminant de Cx45 pour gouverner une composition favorite.

c) Cinétiques de désactivation

1. Induction d'expression de Cx45

Au contraire du couplage intercellulaire et de la dépendance au potentiel, les cinétiques de désactivation des canaux de jonction sont influencées par le niveau d'expression de Cx45. Notre étude montre des cinétiques de désactivation ralenties et similaires à celles des canaux homotypiques Cx45 pour une expression maximale de Cx45 (ratio Cx43:Cx45=1). Ceci confirme la contribution de Cx45 qui semble être l'isoforme dominante. Plus précisément, la désactivation se

fait en partie via le domaine C-terminal des Cx43 et Cx45 (Bukauskas et al., 2000; Revilla et al., 1999; Stergiopoulos et al., 1999) qui peuvent interagir avec une affinité supérieure entre domaines de Cx43 et Cx45 sous forme hétéromérique qu'homomériques Cx43 (Kopanic et al., 2014). Ceci peut expliquer l'inhibition du mécanisme « ball and chain » de fermeture rapide de Cx43 par Cx45, localisé au niveau du domaine C-terminal par une interaction des domaines C-terminaux (Elenes et al., 2001).

2. ARNi anti-Cx43

Par contre, la diminution d'expression de la Cx43 ne modifie pas les cinétiques de désactivation par rapport aux conditions sans ARNi anti-Cx43, qui peut être corrélée avec la contribution majeure de Cx45 au niveau des cinétiques de désactivation.

d) Cinétiques de restitution

1. Induction d'expression de Cx45

Les cinétiques de restitution, peu étudiées avant notre étude, montrent une dépendance aux ratios de co-expressions, ainsi qu'à l'amplitude du potentiel de jonction de manière similaire aux cinétiques de désactivation : plus l'amplitude du potentiel de jonction est importante, plus les cinétiques de restitution sont rapides. Un mécanisme similaire à celui de la fermeture des canaux de jonctions, mais inverse est sûrement responsable de cette activité. Nous observons également une augmentation ou une diminution de l'état stable de restitution des canaux (caractérisé par $g_{P2}/g_{P1} \neq 1$ – cf. résultats) dans la majorité des conditions. A ce stade, une dynamique d'équilibre entre la désactivation et la restitution des canaux est certainement responsable de ces états stables. Ainsi, un $g_{P2}/g_{P1} < 1$ reflète une dominance de la désactivation au contraire d'un $g_{P2}/g_{P1} > 1$ caractérisant une dominance de restitution. Ceci reste à approfondir par une étude complémentaire des cinétiques de restitution afin de déterminer avec précision le mécanisme et les propriétés de la restitution des canaux.

2. ARNi anti-Cx43

De plus, la diminution du niveau d'expression de Cx43 semble ralentir les cinétiques de restitution, qui suggère que la Cx43 permet d'accélérer ces cinétiques. Une étude approfondie sur ces changements doit être réalisée afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

e) Conductances unitaires

1. Induction d'expression de Cx45

Notre étude des propriétés unitaires présente des conductances unitaires ($\gamma_m \approx 50 \text{ pS}$, $\gamma_r \approx 15 \text{ pS}$) intermédiaires à celles des canaux homotypiques Cx43 ($\gamma_m \approx 60 \text{ pS}$, $\gamma_r \approx 20 \text{ pS}$) et Cx45 ($\gamma_m \approx 30 \text{ pS}$, $\gamma_r \approx 10 \text{ pS}$) (Desplantez et al., 2011) dans les conditions d'induction de Cx45. Nous observons des valeurs de conductances unitaires plus proches des canaux homotypiques Cx43, ce qui sous-entend une composition plus importante en Cx43 qu'en Cx45. Cette hypothèse n'est valable que si la formation de canaux de jonctions ne possède pas des propriétés électriques non prévisibles comme il a été observées pour des co-expression Cx43 et Cx40 (Cottrell and Burt, 2001; He et al., 1999; Valiunas et al., 2001; V Valiunas et al., 2000a).

2. ARNi anti-Cx43

Les conductances unitaires observées dans le cas d'une transfection avec ARNi anti-Cx43 ne sont pas modifiées par rapport aux conditions sans ARNi anti-Cx43. La composition en connexines des canaux de jonction ne semble pas être modifiée par la diminution du niveau d'expression de Cx43. Ceci reflète une contribution différente des connexines dans la formation des canaux de jonctions.

3. Contribution des canaux de jonctions

De façon déterminante l'étude de Desplantez et al., 2015 montre que les canaux hétéromériques sont formés en minorité (<10% des connexines totales) au contraire de notre étude électrophysiologique qui indique la contribution majoritaire de ces hétéromériques (~95%). En complément, des canaux homotypiques et hétérotypiques sont retrouvés en très faible proportions (~5% des canaux de jonctions totaux). Ceci montre que les canaux hétéromériques ont un rôle dominant dans les propriétés électriques. Au contraire, les canaux homotypiques et hétérotypiques régulent de façon minoritaire les propriétés électriques ce qui suggèrent d'autres fonctions. Par exemple ils peuvent assurer un passage de métabolites entre les myocytes (ATP : (Goldberg et al., 2002), IP3 : (Kang et al., 2014)), mais aussi réguler la densité de canaux Nav1.5 au niveau des disques intercalaires (T. Desplantez et al., 2012; Jansen et al., 2012) et l'interaction entre connexines et autres protéines partenaires au niveau des disques intercalaires (IP3R : (Zeng et al., 2014)). Cela signifierait qu'il existe une spécialisation relative des canaux de jonction en fonction de leur configuration.

III/ Importances physio-pathologiques des co-expressions

Les propriétés électriques observées peuvent nous permettre de mieux comprendre l'importance des ratios de co-expressions des connexines sur la régulation physiologique ou pathologiques du potentiel d'action cardiaque. Nous nous sommes concentrés sur les Cx43 et Cx45, isoformes utilisées dans cette étude.

a) Importances Physiologiques

Notre étude a porté sur les ratios de co-expressions de ces deux connexines afin de corrélérer au système cardiaque, telles que la situation observée dans les myocytes ventriculaires qui expriment les Cx43 et Cx45. Plus précisément, il existe une interface entre les myocytes des fibres

de Purkinje et les myocytes ventriculaires. Les myocytes des fibres de Purkinje expriment les Cx40, Cx43 et Cx45 (Vozzi et al., 1999) et les myocytes ventriculaires expriment en majorité la Cx43 et des traces de Cx45 (Bao et al., 2011; Vozzi et al., 1999), interposées par des cellules de transitions qui expriment un gradient de niveau d'expression de Cx45 (plus important à l'interface des fibres de Purkinje qu'à l'interface des myocytes ventriculaires). Cela suggère une fonction de « transition » assurée par Cx45 entre la Cx40 des fibres de Purkinje et la Cx43 des myocytes ventriculaires (Severs et al 2008). De plus, les myocytes ventriculaires possèdent également un gradient d'expression transmural de Cx45 avec un niveau d'expression supérieur à l'endocarde qui diminue jusqu'à l'épicarde. Il existe donc des zones où les isoformes et niveaux d'expression des connexines diffèrent. Ces exemples montrent que les profils cardiaques des connexines peuvent induire la formation de canaux de jonction de configurations différentes de par leurs compositions et configurations, de la même façon que celle démontrée par notre étude. Ainsi notre étude est essentielle pour déterminer quelles peuvent être les ratios de co-expression favorisant une propagation du potentiel d'action physiologique ou pro-arythmique.

D'autres zones cardiaques au sein d'un même tissu et à l'interface de tissus possèdent des profils d'expressions de connexines différents mais au contraire des ventricules avec trois isoformes de connexines rendant plus complexe l'interprétation de la contribution des connexines. Par exemple, les myocytes du nœud sinusal co-expriment Cx45 et des traces de Cx30.2 (Coppen et al., 1999; Kreuzberg et al., 2005) et les myocytes des oreillettes co-expriment Cx40, Cx43 et Cx45 (Vozzi et al., 1999). Les canaux de jonctions formés peuvent donc avoir du côté du nœud sinusal un demi canal composé de Cx45 et l'autre demi canal composé hétéromérique (principalement Cx43 et Cx40 avec des traces de Cx45).

b) Contributions Pathologiques

Un remodelage pathologique de Cx43 (modification du niveau d'expression et latéralisation) a été observé (Bruce et al., 2008; Dupont et al., 2001; Gutstein et al., 2001; Paul et al., 2013) et modifie les ratios de co-expressions Cx43:Cx45 dans les ventricules. Il est supposé que ces modifications de niveaux d'expressions n'apparaissent pas immédiatement mais graduellement.

Notre étude peut ainsi déterminer si ces modifications graduelles ont un effet dans la régulation de la propagation pro-arythmique du potentiel d'action.

De par notre étude, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une augmentation du niveau d'expression de Cx45 et une diminution du niveau d'expression de la Cx43 régule la propagation physiologique ou pathologique du potentiel d'action de manière directe ou indirecte. En effet, une diminution du couplage peut entraîner un ralentissement de la propagation du potentiel d'action (Beauchamp, 2004). De plus, une diminution du niveau d'expression de la Cx43 entraîne une diminution de la quantité de canaux Nav1.5 au niveau des disques intercalaires pouvant entraîner un défaut de la dépolarisation (Jansen et al., 2012), ce qui peut participer à un ralentissement de la vitesse de propagation du potentiel d'action, tandis qu'une augmentation du niveau d'expression de Cx45 direct ou indirect (par une diminution du niveau des connexines avec lesquelles Cx45 est co-exprimée) pourrait participer à une diminution de la propagation du potentiel d'action et avoir un effet pro-arythmique (Betsuyaku et al., 2006).

Des études approfondies sur ces gradients de niveau d'expression des connexines et la formation de canaux de jonction résultant ainsi que leurs propriétés électriques devront être réalisées afin de déterminer leur importance dans la régulation de la propagation du potentiel d'action. Ceci permettra de mieux comprendre si une modification des niveaux d'expressions des connexines est physiologique ou pro-arythmique.

IV/ Perspectives d'études

En perspective à mon étude, il est critique de corréler notre étude au système cardiaque. Pour cela différents outils biologiques promettent des études futures déterminantes sur la régulation de la propagation du potentiel d'action et la contribution des différentes isoformes de connexines, et principalement Cx43, Cx40 et Cx45

D'une part, afin de comparer les différentes contributions des connexines (niveau d'expression, type) une étude similaire à la mienne basée sur les ratios de co-expression Cx43 et Cx40 est réalisée au laboratoire. Cette étude montre que les propriétés électriques macroscopiques sont

dépendante du ratio de co-expression au contraire de notre étude. De plus, la contribution de canaux de jonction hétéromériques est dépendante du niveau d'expression de la Cx40 : plus le niveau d'expression de Cx40 est important, plus la contribution de canaux hétéromérique est importante (Chaigne S et al., soumis). Ceci montre une contribution différente des connexines dans la formation et les propriétés et fonctions des canaux de jonctions en fonction des niveaux respectifs d'expression mais aussi du type de connexines co-exprimées. Une approche identique basée les isoformes Cx40 et Cx45 permettrait de mieux comprendre leurs différentes contributions dans la formation des canaux de jonction et leurs propriétés électriques. Pour cela il faudra envisager un autre modèle cellulaire que les RLE afin de s'abstenir de l'expression endogène de Cx43, tel que les cellules N2A (neuroblastoma) et HeLa.

D'autre part, l'étude de la propagation du potentiel d'action sur paire de cellules par double voltage clamp et sur une monocouche cellulaire par « micro-electrode arrays » (MEAs) sur la lignée cellulaire HL-1 (cellules atriales) est actuellement en cours. Cette lignée, dérivée de cellules atriales murines, co-exprime les Cx40, Cx43 et Cx45 (Dias et al., 2014) qui rend l'interprétation des résultats en fonction des co-expressions plus complexes. L'étude en cours sur double voltage clamp caractérise les propriétés électriques des canaux de jonctions, qui seront corrélées à l'étude sur la propagation d'un potentiel d'action des changements de niveau d'expression des connexines. A ce jour, notre étude par MEAs montre des modifications des vitesses de propagations du potentiel d'action en fonction de l'expression des connexines. Plus précisément une diminution d'expression de Cx40 cause un ralentissement de la conduction électrique et se caractérise par un potentiel pro-arythmique plus prononcé qu'en condition contrôle lors de stimulations électriques (Constantin M et al., en soumission).

De même que l'étude sur myocytes cardiaques, une approche sur les fibroblastes qui sont des cellules non excitables présentes de manière importante dans le cœur (Camelliti et al., 2005) est intéressante pour déterminer leur contribution physiopathologique dans la propagation du potentiel d'action. Ceci s'illustre par exemple par l'apparition d'arythmies avec l'augmentation du nombre de fibroblaste et de leurs couplages avec les myocytes (Rohr, 2012). Une étude en cours au laboratoire sur fibroblastes ventriculaires de rat a caractérisé la co-expression de Cx40, Cx43 et Cx45, tandis que le couplage électrique est assuré principalement par les canaux

homotypiques Cx43 (Constantin et al, en révision). De même il est intéressant d'étudier le couplage entre myocytes et fibroblastes et caractériser les propriétés électriques des canaux de jonction formés et leur influence sur la régulation de la propagation du potentiel d'action. Pour cela des co-cultures entre HL-1 et fibroblastes ont été réalisées au laboratoire. Les résultats préliminaires indiquent un bloc de conduction par les fibroblastes, ainsi qu'une absence de couplage électrique entre HL-1 et fibroblastes.

Enfin, des études sur des cellules cardiaques (myocytes et fibroblastes) de modèles animaux seront importantes pour étendre et corréler nos approches et résultats obtenus sur modèles cellulaires et mieux comprendre les contributions des connexines sur la régulation de la propagation du potentiel d'action. Par exemple des études sur souris transgéniques « knock out » pour la Cx43 (Reaume et al., 1995), la Cx45 (« knock out » inductible, (Nishii et al., 2003)) pourront permettre ces analyses. Ces modèles présentent aussi des difficultés au plan technique (utilisation d'animaux transgéniques avec une mortalité à la naissance) et au plan biologique (le contrôle du niveau d'expression précis de connexines et des ratios de co-expressions est plus complexe dans un modèle animal).

Références

- Agullo-Pascual, E.**, Reid, D.A., Keegan, S., Sidhu, M., Fenyö, D., Rothenberg, E., Delmar, M., 2013. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc. Res.* 100, 231–240. doi:10.1093/cvr/cvt191
- Alcoléa, S.**, Théveniau-Ruissy, M., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Tzouanacou, E., Chauvin, J.P., Briand, J.P., Moorman, A.F., Lamers, W.H., Gros, D.B., 1999. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ. Res.* 84, 1365–1379.
- Altomare, C.**, Terragni, B., Brioschi, C., Milanese, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., DiFrancesco, D., 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 549, 347–359. doi:10.1113/jphysiol.2002.027698
- Anderson, C.L.**, Zundel, M.A., Werner, R., 2005. Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. *Genomics* 85, 238–244. doi:10.1016/j.ygeno.2004.11.007
- Anderson, R.H.**, Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Moorman, A.F.M., 2013. The anatomy of the conduction system: implications for the clinical cardiologist. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 187–196. doi:10.1007/s12265-012-9433-0
- Anumonwo, J.M.**, Taffet, S.M., Gu, H., Chanson, M., Moreno, A.P., Delmar, M., 2001. The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels 666–673.
- Atkinson, M.M.**, Lampe, P.D., Lin, H.H., Kollander, R., Li, X.R., Kiang, D.T., 1995. Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 9), 3079–3090.
- Banach, K.**, Weingart, R., 2000. Voltage gating of Cx43 gap junction channels involves fast and slow current transitions 248–250.
- Bao, M.**, Kanter, E.M., Huang, R.Y.-C., Maxeiner, S., Frank, M., Zhang, Y., Schuessler, R.B., Smith, T.W., Townsend, R.R., Rohrs, H.W., Berthoud, V.M., Willecke, K., Laing, J.G., Yamada, K.A., 2011b. Residual Cx45 and its relationship to Cx43 in murine ventricular myocardium. *Channels Austin Tex* 5, 489–499. doi:10.4161/chan.5.6.18523
- Bargiello, T.A.**, Tang, Q., Oh, S., Kwon, T., 2012. Voltage-dependent conformational changes in connexin channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1807–1822. doi:10.1016/j.bbamem.2011.09.019

- Barrio, L.C.**, Capel, J., Jarillo, J.A., Castro, C., Revilla, A., 1997. Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 73, 757–769. doi:10.1016/S0006-3495(97)78108-6
- Baruscotti, M.**, Bucchi, A., Difrancesco, D., 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol. Ther.* 107, 59–79. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.01.005
- Beardslee, M.A.**, Laing, J.G., Beyer, E.C., Saffitz, J.E., 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* 83, 629–635.
- Beauchamp, P.**, Choby, C., Desplantez, T., de Peyer, K., Green, K., Yamada, K.A., Weingart, R., Saffitz, J.E., Kléber, A.G., 2004. Electrical propagation in synthetic ventricular myocyte strands from germline connexin43 knockout mice. *Circ. Res.* 95, 95 (2): 170-178. doi:10.1161/01.RES.0000134923.05174.2f
- Beauchamp, P.**, Desplantez, T., McCain, M.L., Li, W., Asimaki, A., Rigoli, G., Parker, K.K., Saffitz, J.E., Kleber, A.G., 2012. Electrical coupling and propagation in engineered ventricular myocardium with heterogeneous expression of connexin43. *Circ. Res.* 110, 1445–1453. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259705
- Beauchamp, P.**, Yamada, K.A., Baertschi, A.J., Green, K., Kanter, E.M., Saffitz, J.E., Kléber, A.G., 2006. Relative contributions of connexins 40 and 43 to atrial impulse propagation in synthetic strands of neonatal and fetal murine cardiomyocytes. *Circ. Res.* 99, 1216–1224. doi:10.1161/01.RES.0000250607.34498.b4
- Bedner, P.**, Niessen, H., Odermatt, B., Kretz, M., Willecke, K., Harz, H., 2006. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 281, 6673–6681. doi:10.1074/jbc.M511235200
- Belluardo, N.**, White, T.W., Srinivas, M., Trovato-Salinaro, A., Ripps, H., Mudò, G., Bruzzone, R., Condorelli, D.F., 2001. Identification and functional expression of HCx31.9, a novel gap junction gene. *Cell Commun. Adhes.* 8, 173–178.
- Bennett, M.V.**, Zheng, X., Sogin, M.L., 1994. The connexins and their family tree. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 49, 223–233.

- Berenfeld, O., Zaitsev, A.V., 2004.** The muscular network of the sheep right atrium and frequency-dependent breakdown of wave propagation. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 1053–1061. doi:10.1002/ar.a.20106
- Bers, D.M., Perez-Reyes, E., 1999.** Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.* 42, 339–360.
- Betsuyaku, T., Nnebe, N.S., Sundset, R., Patibandla, S., Krueger, C.M., Yamada, K.A., 2006.** Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H163-171. doi:10.1152/ajpheart.01308.2004
- Beyer, E.C., Gemel, J., Martínez, A., Berthoud, V.M., Valiunas, V., Moreno, A.P., Brink, P.R., 2001.** Heteromeric mixing of connexins: compatibility of partners and functional consequences. *Cell Commun. Adhes.* 8, 199–204.
- Beyer, E.C., Paul, D.L., Goodenough, D.A., 1987.** Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver 2621–2629.
- Bikou, O., Thomas, D., Trappe, K., Lugenbiel, P., Kelemen, K., Koch, M., Soucek, R., Voss, F., Becker, R., Katus, H.A., Bauer, A., 2011.** Connexin 43 gene therapy prevents persistent atrial fibrillation in a porcine model. *Cardiovasc. Res.* 92, 218–225. doi:10.1093/cvr/cvr209
- Björkman, N., 1962.** A STUDY OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE GRANULOSA CELLS OF THE RAT OVARY. *Cells Tissues Organs* 51, 125–147. doi:10.1159/000141943
- Bonda, T.A., Szynaka, B., Sokołowska, M., Dziemidowicz, M., Winnicka, M.M., Chyczewski, L., Kamiński, K.A., 2015.** Remodeling of the intercalated disc related to aging in the mouse heart. *J. Cardiol.* doi:10.1016/j.jjcc.2015.10.001
- Bruce, A.F., Rothery, S., Dupont, E., Severs, N.J., 2008.** Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc. Res.* 77, 757–765. doi:10.1093/cvr/cvm083
- Bukauskas, F.F., Bukauskiene, A., Bennett, M.V.L., Verselis, V.K., 2001.** Gating Properties of Gap Junction Channels Assembled from Connexin43 and Connexin43 Fused with Green Fluorescent Protein. *Biophys. J.* 81, 137–152. doi:10.1016/S0006-3495(01)75687-1

- Bukauskas, F.F.**, Elfgang, C., Willecke, K., Weingart, R., 1995. Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells 2289–2298.
- Bukauskas, F.F.**, Jordan, K., Bukauskiene, A., Bennett, M.V., Lampe, P.D., Laird, D.W., Verselis, V.K., 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells 2556–2561.
- Bukauskas, F.F.**, Peracchia, C., 1997. Two distinct gating mechanisms in gap junction channels: CO₂-sensitive and voltage-sensitive. *Biophys. J.* 72, 2137–2142. doi:10.1016/S0006-3495(97)78856-8
- Bukauskas, F.F.**, Verselis, V.K., 2004. Gap junction channel gating. *Biochim. Biophys. Acta* 1662, 42–60. doi:10.1016/j.bbamem.2004.01.008
- Catterall, W.A.**, 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- Camelliti, P.**, Borg, T.K., Kohl, P., 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65, 40–51. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.020
- Chaigne, S.**, Dupuis, S., Desplantez, T., 2015. Specific GJCs make-up in function of accurate ratios of Cx40/Cx43 and Cx43/Cx45. *Abstr. Book - Int. Gap Junction Conf. Valpso.* 2015 1, 16.
- Colussi, C.**, Rosati, J., Straino, S., Spallotta, F., Berni, R., Stilli, D., Rossi, S., Musso, E., Macchi, E., Mai, A., Sbardella, G., Castellano, S., Chimenti, C., Frustaci, A., Nebbioso, A., Altucci, L., Capogrossi, M.C., Gaetano, C., 2011. Nε-lysine acetylation determines dissociation from GAP junctions and lateralization of connexin 43 in normal and dystrophic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2795–2800. doi:10.1073/pnas.1013124108
- Cooper, C.D.**, Lampe, P.D., 2002. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 44962–44968. doi:10.1074/jbc.M209427200
- Coppen, S.R.**, Gourdie, R.G., Severs, N.J., 2001. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp. Clin. Cardiol.* 6, 17–23.

- Coppen, S.R.**, Kaba, R.A., Halliday, D., Dupont, E., Skepper, J.N., Elneil, S., Severs, N.J., 2003. Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart 121–127.
- Coppen, S.R.**, Kodama, I., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Takagishi, Y., Honjo, H., Yeh, H.I., Severs, N.J., 1999a. Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border 907–918.
- Coppen, S.R.**, Severs, N.J., Gourdie, R.G., 1999b. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart 82–90.
- Cottrell, G.T.**, Burt, J.M., 2001. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons C1559-1567.
- Cottrell, G.T.**, Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Lau, A.F., Burt, J.M., 2003. Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C511-520. doi:10.1152/ajpcell.00214.2002
- Cottrell, G.T.**, Wu, Y., Burt, J.M., 2002. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1469-1482. doi:10.1152/ajpcell.00484.2001
- DeBerg, H.A.**, Brzovic, P.S., Flynn, G.E., Zagotta, W.N., Stoll, S., 2016. Structure and Energetics of Allosteric Regulation of HCN2 Ion Channels by Cyclic Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 291, 371–381. doi:10.1074/jbc.M115.696450
- Delorme, B.**, Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., Théveniau-Ruissy, M., 1997. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system 423–437.
- Delorme, B.**, Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., Théveniau-Ruissy, M., 1995. Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system 358–371.
- Desplantez, T.**, Dupont, E., Severs, N.J., Weingart, R., 2007. Gap Junction Channels and Cardiac Impulse Propagation. *J. Membr. Biol.* 218, 13–28. doi:10.1007/s00232-007-9046-8

- Desplantez, T.**, Grikscheit, K., Thomas, N.M., Peters, N.S., Severs, N.J., Dupont, E., 2015. Relating specific connexin co-expression ratio to connexon composition and gap junction function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 89, 195–202. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.008
- Desplantez, T.**, Halliday, D., Dupont, E., Severs, N.J., Weingart, R., 2011. Influence of v5/6-His tag on the properties of gap junction channels composed of connexin43, connexin40 or connexin45. *J. Membr. Biol.* 240, 139–150. doi:10.1007/s00232-011-9352-z
- Desplantez, T.**, Halliday, D., Dupont, E., Weingart, R., 2004. Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 363–375. doi:10.1007/s00424-004-1250-0
- Desplantez, T.**, Marics, I., Jarry-Guichard, T., Veteikis, R., Briand, J.-P., Weingart, R., Gros, D., 2003. Characterization of zebrafish Cx43.4 connexin and its channels. *Exp. Physiol.* 88, 681–690.
- Desplantez, T.**, McCain, M.L., Beauchamp, P., Rigoli, G., Rothen-Rutishauser, B., Parker, K.K., Kleber, A.G., 2012. Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current. *Cardiovasc. Res.* 94, 58–65. doi:10.1093/cvr/cvs025
- Dhillon, P.S.**, Gray, R., Kojodjojo, P., Jabr, R., Chowdhury, R., Fry, C.H., Peters, N.S., 2013. Relationship between gap-junctional conductance and conduction velocity in mammalian myocardium. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 6, 1208–1214. doi:10.1161/CIRCEP.113.000848
- Dias, P.**, Desplantez, T., El-Harasis, M.A., Chowdhury, R.A., Ullrich, N.D., Cabestrero de Diego, A., Peters, N.S., Severs, N.J., MacLeod, K.T., Dupont, E., 2014. Characterisation of Connexin Expression and Electrophysiological Properties in Stable Clones of the HL-1 Myocyte Cell Line. *PLoS ONE* 9, e90266. doi:10.1371/journal.pone.0090266
- Dupont, E.**, Matsushita, T., Kaba, R.A., Vozzi, C., Coppens, S.R., Khan, N., Kaprielian, R., Yacoub, M.H., Severs, N.J., 2001. Altered Connexin Expression in Human Congestive Heart Failure 359–371.
- Ek Vitorín, J.F.**, Pontifex, T.K., Burt, J.M., 2016. Determinants of Cx43 Channel Gating and Permeation: The Amino Terminus. *Biophys. J.* 110, 127–140. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.054

- Elenes, S.**, Martinez, A.D., Delmar, M., Beyer, E.C., Moreno, A.P., 2001. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys. J.* 81, 1406–1418. doi:10.1016/S0006-3495(01)75796-7
- Foote, C.I.**, Zhou, L., Zhu, X., Nicholson, B.J., 1998. The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140, 1187–1197.
- Frank, M.**, Wirth, A., Andrié, R.P., Kreuzberg, M.M., Dobrowolski, R., Seifert, G., Offermanns, S., Nickenig, G., Willecke, K., Schrickel, J.W., 2012. Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ. Res.* 111, 1528–1538. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.270561
- Gaietta, G.**, Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503–507. doi:10.1126/science.1068793
- Goldberg, G.S.**, Moreno, A.P., Lampe, P.D., 2002. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J. Biol. Chem.* 277, 36725–36730. doi:10.1074/jbc.M109797200
- Gourdie, R.G.**, Green, C.R., Severs, N.J., 1991. Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 1), 41–55.
- Grandi, E.**, Pandit, S.V., Voigt, N., Workman, A.J., Dobrev, D., Jalife, J., Bers, D.M., 2011. Human atrial action potential and Ca²⁺ model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Circ. Res.* 109, 1055–1066. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253955
- Grikscheit, K.**, Thomas, N., Bruce, A.F., Rothery, S., Chan, J., Severs, N.J., Dupont, E., 2008b. Coexpression of connexin 45 with connexin 43 decreases gap junction size. *Cell Commun. Adhes.* 15, 185–193. doi:10.1080/15419060802013943
- Gros, D.B.**, Jongsma, H.J., 1996. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 18, 719–730. doi:10.1002/bies.950180907

- Gutstein, D.E.**, Liu, F.-Y., Meyers, M.B., Choo, A., Fishman, G.I., 2003. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J. Cell Sci.* 116, 875–885.
- Gutstein, D.E.**, Morley, G.E., Vaidya, D., Liu, F., Chen, F.L., Stuhlmann, H., Fishman, G.I., 2001. Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction 1194–1199.
- Halliday, D.**, Dupont, E., Coppin, S.R., Severs, N.J., 2003. Development of a cell model for functional and structural analysis of connexin co-expression: achieving homogeneous and inducible expression of multiple connexins in stable transfectants 311–317.
- Harris, A.L.**, 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap 325–472.
- He, D.S.**, Jiang, J.X., Taffet, S.M., Burt, J.M., 1999. Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells 6495–6500.
- Hennemann, H.**, Suchyna, T., Lichtenberg-Fraté, H., Jungbluth, S., Dahl, E., Schwarz, J., Nicholson, B.J., Willecke, K., 1992. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J. Cell Biol.* 117, 1299–1310.
- Hertlein, B.**, Butterweck, A., Haubrich, S., Willecke, K., Traub, O., 1998. Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* 162, 247–257.
- Hunter, A.W.**, Barker, R.J., Zhu, C., Gourdie, R.G., 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion 5686–5698.
- Hunter, A.W.**, Gourdie, R.G., 2008. The second PDZ domain of zonula occludens-1 is dispensable for targeting to connexin 43 gap junctions. *Cell Commun. Adhes.* 15, 55–63. doi:10.1080/15419060802014370
- Jansen, J.A.**, Noorman, M., Musa, H., Stein, M., de Jong, S., van der Nagel, R., Hund, T.J., Mohler, P.J., Vos, M.A., van Veen, T.A., de Bakker, J.M., Delmar, M., van Rijen, H.V., 2012. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice 600–607.

- Jordan, K.**, Chodock, R., Hand, A.R., Laird, D.W., 2001. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell Sci.* 114, 763–773.
- Kang, M.**, Lin, N., Li, C., Meng, Q., Zheng, Y., Yan, X., Deng, J., Ou, Y., Zhang, C., He, J., Luo, D., 2014. Cx43 phosphorylation on S279/282 and intercellular communication are regulated by IP3/IP3 receptor signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* 12, 58. doi:10.1186/s12964-014-0058-6
- Kato, T.**, Iwasaki, Y., Nattel, S., 2012. Connexins and Atrial Fibrillation Filling in the Gaps. *Circulation* 125, 125:203-206. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075432
- Kjenseth, A.**, Fykerud, T.A., Sirnes, S., Bruun, J., Yohannes, Z., Kolberg, M., Omori, Y., Rivedal, E., Leithe, E., 2012. The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. *J. Biol. Chem.* 287, 15851–15861. doi:10.1074/jbc.M111.281832
- Kléber, A.G.**, Janse, M.J., Fast, V.G., 2001. Normal and Abnormal Conduction in the Heart, Handbook of Physiology. Oxford University Press.
- Kopanic, J.L.**, Al-mugotir, M.H., Kieken, F., Zach, S., Trease, A.J., Sorgen, P.L., 2014. Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners. *Biophys. J.* 106, 2184–2195. doi:10.1016/j.bpj.2014.03.045
- Koval, M.**, Geist, S.T., Westphale, E.M., Kemendy, A.E., Civitelli, R., Beyer, E.C., Steinberg, T.H., 1995. Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. *J. Cell Biol.* 130, 987–995.
- Kreuzberg, M.M.**, Schrickel, J.W., Ghanem, A., Kim, J.-S., Degen, J., Janssen-Bienhold, U., Lewalter, T., Tiemann, K., Willecke, K., 2006. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5959–5964. doi:10.1073/pnas.0508512103
- Kreuzberg, M.M.**, Söhl, G., Kim, J.-S., Verselis, V.K., Willecke, K., Bukauskas, F.F., 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart 1169–1177.

- Krüger, O.**, Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., Willecke, K., 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice 4179–4193.
- Kumai, M.**, Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., Shibata, Y., 2000. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3501–3512.
- Kwon, T.**, Tang, Q., Bargiello, T.A., 2013. Voltage-dependent gating of the Cx32*43E1 hemichannel: conformational changes at the channel entrances 243–259.
- Laing, J.G.**, Beyer, E.C., 1995. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26399–26403.
- Laing, J.G.**, Tadros, P.N., Green, K., Saffitz, J.E., Beyer, E.C., 1998. Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 38, 711–718.
- Laird, D.W.**, Puranam, K.L., Revel, J.P., 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273(Pt 1), 67–72.
- Lampe, P.D.**, 1994. Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J. Cell Biol.* 127, 1895–1905.
- Lampe, P.D.**, TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., Lau, A.F., 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 149, 1503–1512.
- Leykauf, K.**, Salek, M., Bomke, J., Frech, M., Lehmann, W.-D., Dürst, M., Alonso, A., 2006. Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *J. Cell Sci.* 119, 3634–3642. doi:10.1242/jcs.03149
- Lin, X.**, Gemel, J., Glass, A., Zemlin, C.W., Beyer, E.C., Veenstra, R.D., 2010. Connexin40 and connexin43 determine gating properties of atrial gap junction channels 238–245.
- Lin, X.**, Veenstra, R.D., 2004. Action potential modulation of connexin40 gap junctional conductance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1726-1735. doi:10.1152/ajpheart.00943.2003

- Liu, F.**, Arce, F.T., Ramachandran, S., Lal, R., 2006. Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *J. Biol. Chem.* 281, 23207–23217. doi:10.1074/jbc.M605048200
- Martinez, A.D.**, Hayrapetyan, V., Moreno, A.P., Beyer, E.C., 2002. Connexin43 and Connexin45 Form Heteromeric Gap Junction Channels in Which Individual Components Determine Permeability and Regulation. *Circ. Res.* 90, 90: 1100-1107. doi:10.1161/01.RES.0000019580.64013.31
- McCain, M.L.**, Desplantez, T., Geisse, N.A., Rothen-Rutishauser, B., Oberer, H., Parker, K.K., Kleber, A.G., 2012. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H443-450. doi:10.1152/ajpheart.01218.2010
- Meraviglia, V.**, Azzimato, V., Colussi, C., Florio, M.C., Binda, A., Panariti, A., Qanud, K., Suffredini, S., Gennaccaro, L., Miragoli, M., Barbuti, A., Lampe, P.D., Gaetano, C., Pramstaller, P.P., Capogrossi, M.C., Recchia, F.A., Pompilio, G., Rivolta, I., Rossini, A., 2015. Acetylation mediates Cx43 reduction caused by electrical stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 54–64. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.08.001
- Miquerol, L.**, Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H.V.M., Abran, P., Jongasma, H., Nargeot, J., Gros, D., 2004. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc. Res.* 63, 77–86. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.007
- Moreno, A.P.**, Chanson, M., Elenes, S., Anumonwo, J., Scerri, I., Gu, H., Taffet, S.M., Delmar, M., 2002. Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating 450–457.
- Moreno, A.P.**, Laing, J.G., Beyer, E.C., Spray, D.C., 1995. Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am. J. Physiol.* 268, C356-365.
- Musil, L.S.**, Goodenough, D.A., 1990. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 875–880.

- Nakagawa, S.**, Gong, X.-Q., Maeda, S., Dong, Y., Misumi, Y., Tsukihara, T., Bai, D., 2011. Asparagine 175 of connexin32 is a critical residue for docking and forming functional heterotypic gap junction channels with connexin26. *J. Biol. Chem.* 286, 19672–19681. doi:10.1074/jbc.M110.204958
- Niessen, H.**, Harz, H., Bedner, P., Krämer, K., Willecke, K., 2000. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 8), 1365–1372.
- Nishii, K.**, Kumai, M., Egashira, K., Miwa, T., Hashizume, K., Miyano, Y., Shibata, Y., 2003. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect 365–369.
- Oyamada, M.**, Takebe, K., Oyamada, Y., 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 118–133. doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.031
- Paul, M.**, Wichter, T., Gerss, J., Arps, V., Schulze-Bahr, E., Robenek, H., Breithardt, G., Weissen-Plenz, G., 2013. Connexin Expression Patterns in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 111, 1488–1495. doi:10.1016/j.amjcard.2013.01.299
- Polontchouk, L.O.**, Valiunas, V., Haefliger, J.-A., Eppenberger, H.M., Weingart, R., 2002. Expression and regulation of connexins in cultured ventricular myocytes isolated from adult rat hearts. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 443, 676–689. doi:10.1007/s00424-001-0747-z
- Purnick, P.E.**, Oh, S., Abrams, C.K., Verselis, V.K., Bargiello, T.A., 2000. Reversal of the gating polarity of gap junctions by negative charge substitutions in the N-terminus of connexin 32 2403–2415.
- Rackauskas, M.**, Kreuzberg, M.M., Pranevicius, M., Willecke, K., Verselis, V.K., Bukauskas, F.F., 2007. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45 1952–1965.
- Reaume, A.G.**, de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J., 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 1831–1834.

- Revilla, A.,** Castro, C., Barrio, L.C., 1999. Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin-32 and connexin-43 junctions 1374–1383.
- Rhett, J.M.,** Gourdie, R.G., 2012. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization 619–623.
- Rhett, J.M.,** Jourdan, J., Gourdie, R.G., 2011. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* 22, 1516–1528. doi:10.1091/mbc.E10-06-0548
- Rhett, J.M.,** Ongstad, E.L., Jourdan, J., Gourdie, R.G., 2012. Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus 411–422.
- Ri, Y.,** Ballesteros, J.A., Abrams, C.K., Oh, S., Verselis, V.K., Weinstein, H., Bargiello, T.A., 1999. The role of a conserved proline residue in mediating conformational changes associated with voltage gating of Cx32 gap junctions 2887–2898.
- Rivedal, E.,** Leithe, E., 2005. Connexin43 synthesis, phosphorylation, and degradation in regulation of transient inhibition of gap junction intercellular communication by the phorbol ester TPA in rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 302, 143–152. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.004
- Rohr, S.,** 2012. Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 5, 442–452. doi:10.1161/CIRCEP.110.957647
- Rossi, S.,** Baruffi, S., Bertuzzi, A., Miragoli, M., Corradi, D., Maestri, R., Alinovi, R., Mutti, A., Musso, E., Sgoifo, A., Brisinda, D., Fenici, R., Macchi, E., 2008. Ventricular activation is impaired in aged rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H2336-2347. doi:10.1152/ajpheart.00517.2008
- Seki, A.,** Duffy, H.S., Coombs, W., Spray, D.C., Taffet, S.M., Delmar, M., 2004. Modifications in the biophysical properties of connexin43 channels by a peptide of the cytoplasmic loop region. *Circ. Res.* 95, e22-28. doi:10.1161/01.RES.0000140737.62245.c5
- Severs, N.J.,** Bruce, A.F., Dupont, E., Rothery, S., 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc. Res.* 80, 9–19. doi:10.1093/cvr/cvn133

- Shaw, R.M.**, Fay, A.J., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Jan, Y.-N., Jan, L.Y., 2007. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 128, 547–560. doi:10.1016/j.cell.2006.12.037
- Shibayama, J.**, Gutiérrez, C., González, D., Kieken, F., Seki, A., Carrión, J.R., Sorgen, P.L., Taffet, S.M., Barrio, L.C., Delmar, M., 2006. Effect of charge substitutions at residue his-142 on voltage gating of connexin43 channels 4054–4063.
- Smith, T.D.**, Mohankumar, A., Minogue, P.J., Beyer, E.C., Berthoud, V.M., Koval, M., 2012. Cytoplasmic amino acids within the membrane interface region influence connexin oligomerization. *J. Membr. Biol.* 245, 221–230. doi:10.1007/s00232-012-9443-5
- Söhl, G.**, Degen, J., Teubner, B., Willecke, K., 1998. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 428, 27–31.
- Söhl, G.**, Nielsen, P.A., Eiberger, J., Willecke, K., 2003. Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues 27–36.
- Söhl, G.**, Willecke, K., 2004. Gap junctions and the connexin protein family 228–232.
- Solan, J.L.**, Lampe, P.D., 2016. Kinase programs spatiotemporally regulate gap junction assembly and disassembly: Effects on wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 40–48. doi:10.1016/j.semcd.2015.12.010
- Stergiopoulos, K.**, Alvarado, J.L., Mastroianni, M., Ek-Vitorin, J.F., Taffet, S.M., Delmar, M., 1999. Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ. Res.* 84, 1144–1155.
- Tang, Q.**, Dowd, T.L., Verselis, V.K., Bargiello, T.A., 2009. Conformational changes in a pore-forming region underlie voltage-dependent “loop gating” of an unapposed connexin hemichannel 555–570.
- Trexler, E.B.**, Bennett, M.V., Bargiello, T.A., Verselis, V.K., 1996. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5836–5841.

- Valiunas, V.**, Bukauskas, F.F., Weingart, R., 1997. Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells 708–719.
- Valiunas, V.**, Gemel, J., Brink, P.R., Beyer, E.C., 2001. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43 H1675-1689.
- Valiunas, V.**, Manthey, D., Vogel, R., Willecke, K., Weingart, R., 1999. Biophysical properties of mouse connexin30 gap junction channels studied in transfected human HeLa cells 631–644.
- Valiunas, V.**, Vogel, R., Weingart, R., 2000. The kinetics of gap junction currents are sensitive to the ionic composition of the pipette solution. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 440, 835–842.
- Valiunas, V.**, Weingart, R., Brink, P.R., 2000a. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43 E42-49.
- van Rijen, H.V.**, van Veen, T.A., Hermans, M.M., Jongasma, H.J., 2000. Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc. Res.* 45, 941–951.
- van Rijen, H.V.**, Wilders, R., Van Ginneken, A.C., Jongasma, H.J., 1998. Quantitative analysis of dual whole-cell voltage-clamp determination of gap junctional conductance 141–151.
- van Veen, T.A.**, van Rijen, H.V., Jongasma, H.J., 2000. Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 46, 496–510.
- Veenstra, R.D.**, 2001. Voltage clamp limitations of dual whole-cell gap junction current and voltage recordings. I. Conductance measurements. *Biophys. J.* 80, 2231–2247. doi:10.1016/S0006-3495(01)76196-6
- Vozzi, C.**, Dupont, E., Coppen, S.R., Yeh, H.I., Severs, N.J., 1999. Chamber-related differences in connexin expression in the human heart 991–1003.
- Wang, X.**, Li, L., Peracchia, L.L., Peracchia, C., 1996. Chimeric evidence for a role of the connexin cytoplasmic loop in gap junction channel gating. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 431, 844–852.
- Werner, R.**, 2000. IRES elements in connexin genes: a hypothesis explaining the need for connexins to be regulated at the translational level. *IUBMB Life* 50, 173–176. doi:10.1080/152165400300001480

- Whitaker, G.M.**, Angoli, D., Nazzari, H., Shigemoto, R., Accili, E.A., 2007. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* 282, 22900–22909. doi:10.1074/jbc.M610978200
- Yang, Y.-Q.**, Liu, X., Zhang, X.-L., Wang, X.-H., Tan, H.-W., Shi, H.-F., Jiang, W.-F., Fang, W.-Y., 2010. Novel connexin40 missense mutations in patients with familial atrial fibrillation. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 12, 1421–1427. doi:10.1093/europace/euq274
- Zeng, Z.**, Zhang, H., Lin, N., Kang, M., Zheng, Y., Li, C., Xu, P., Wu, Y., Luo, D., 2014. Role of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in the regulation of calcium transients in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 37–46.
- Zimmer, T.**, Haufe, V., Blechschmidt, S., 2014. Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014, 449–463. doi:10.5339/gcsp.2014.58