Ca^{2+} manutention dans un model de souris de CPVT

La tachycardie ventriculaire catécholergique (CPVT) est une maladie héréditaire qui se manifeste par des syncopes voire une mort subite, lors de stress émotionnel ou physique en absence d'altération morphologique du cœur. Bien qu'étant une maladie rare, qui touche 1 à 5 personnes sur 10 000 en Europe, cette maladie n'est malheureusement diagnostiquée qu'après le décès d'un enfant ou jeune adulte dans une famille avec des causes inconnues. Une syncope ou la mort subite peuvent apparaitre dès l'âge de 7 ans. Pour 10-20% des patients, la première manifestation est la mort subite. Les arythmies les plus fréquentes sont la tachycardie ventriculaire bidirectionnelle, mais aussi la tachycardie supraventriculaire, la fibrillation atriale, et la dysfonction sinusale. Au repos, ces patients ont un électrocardiogramme normal, mais une tendance plus importante à la bradycardie.

Des mutations dans 4 gènes ont été identifiées comme étant à l'origine de la CPVT. La plupart des mutations autosomiques dominantes identifiées (~60%, CPVT1) concernent le récepteur de la ryanodine type 2 (RyR_2), canal de libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) cardiaque. D'autres mutations concernent des gènes codant pour des protéines régulatrices du RyR_2 : la calséquestrine (CPVT2, autosomique récessive, qui apparait dans environ 2% de cas), la triadine (autosomique récessive) et la calmoduline1 (autosomique dominante).

Nos collaborateurs ont identifié la mutation RyR_2^{R420Q} chez une famille espagnole atteinte de CPVT. Ces patients ont une dysfonction du *pacemaker* (nœud sinusal, NSA) avec une bradycardie. Nous avons construit une souris portant cette mutation, et étudié l'activité du NSA en analysant le calcium intracellulaire, afin d'élucider les mécanismes impliqués dans cette bradycardie.

Toutes les expériences ont été faites sur des souris, mâles et femelles, d'environ 6 mois, hétérozygotes pour la mutation (KI), et sur leurs frères et sœurs ne portant pas la mutation (WT).

Tout d'abord, pour caractériser les souris, des électrocardiogrammes (ECG) ont été enregistrés en télémétrie. Des capteurs ont été implantés chez la souris en subcutanée sous anesthésie sous isofluorane. Les enregistrements ont été faits au

moins une semaine après la chirurgie, pour que les animaux récupèrent de l'opération. Une injection d'épinéphrine et de caféine (2+120 mg/Kg) en intra-péritonéal a été réalisée, afin de vérifier leur phénotype. Ceci a induit une tachycardie bidirectionnelle chez toutes les souris KI et aucune chez les WT, validant ainsi le modèle. Le rythme cardiaque était similaire pendant la période d'activité (nuit) chez les souris KI et WT, mais plus lent pendant la période de repos (jour) chez les femelles KI. Une stimulation sympathique avec injection d'isoprénaline (ISO 1 mg/kg) a accéléré le rythme de toutes les souris, mais de manière plus importante chez les souris KI. D'autre part, la stimulation parasympathique avec injection de carbachol (CCH 0,25 mg/kg) ralentit le rythme cardiaque de façon similaire chez toutes les souris. En présence d'ISO, un plus grand nombre de souris présentent des échappements jonctionnels, indiquant que l'absence d'activité du NSA durant ces battements.

Afin d'analyser les mécanismes, nous avons disséqué le NSA et l'avons chargé avec un indicateur fluorescent du Ca^{2+} (le fluo-4) puis analysé les mouvements calciques spontanés par microscopie confocale. Cette technique, développée dans le laboratoire, est très délicate mais nous permet d'étudier les mouvements du Ca^{2+} dans la cellule du NSA dans son contexte naturel, sans dissocier le tissu. Ces données *in-vitro* ont montré une différence basale du rythme cardiaque entre mâles et femelles, avec une fréquence de transitoires $[Ca^{2+}]_i$ plus lente chez les femelles. La présence de la mutation ralentie la fréquence des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ chez les deux sexes (WT : mâle 0,66 ± 0,03 s ; femelle 0,76 ± 0,03 s ; KI : mâle 0,76 ± 0,04 s ; femelle 0,94 ± 0,04 s). De plus, ces transitoires $[Ca^{2+}]_i$ ont une plus faible amplitude et une prolongation du temps au pic (amplitude : WT 3,82 ± 0,11 ; KI 3,55 ± 0,10 ; temps au pic : WT 46,95 ± 1,63 ms ; KI 52,41 ± 1,50 ms).

Afin d'évaluer l'activité du RyR_2, nous avons analysé les *sparks* Ca^{2+}, qui sont des évènements élémentaires produits par l'activation d'un cluster de RyR_2s. Nos analyses en microscopie confocale sur des NSA disséqués ont montré que la fréquence des *sparks* Ca^{2+} n'était que légèrement augmentée (WT : mâle 5,92 ± 1,33 sparks×s^{-1}×100µm^{-1}; femelle 6,30 ± 1,07 sparks×s^{-1}×100µm^{-1}; KI : mâle 13,07 ± 2,32 sparks×s^{-1}×100µm^{-1}; femelle 8,03 ± 1,26 sparks×s^{-1}×100µm^{-1}). Par contre, la durée de ces *sparks* est fortement prolongée dans les cellules KI par rapport aux *sparks* Ca^{2+} enregistrés dans les cellules WT (WT : mâle

42,69 ± 0,47 ms ; femelle 36,52 ± 0,37 ms ; KI : mâle 52,98 ± 0,38 ms ; femelle 58,17 ± 0,47 ms). Ceci produit une libération plus importante de Ca^{2+} dans chaque *spark* en moyenne. Ainsi, les cellules KI ont une fuite de Ca^{2+} par unité du temps pendant la diastole plus importante que les cellules WT (WT : mâle 1749,06 ± 28,01 Ca^{2+} release $\times s^{-1} \times 100\mu m^{-1}$; femelle 1679,65 ± 25,09 Ca^{2+} release $\times s^{-1} \times 100\mu m^{-1}$; KI : mâle 5091,91 ± 56,82 Ca^{2+} release $\times s^{-1} \times 100\mu m^{-1}$; femelle 3300,64 ± 36,91 Ca^{2+} release $\times s^{-1} \times 100\mu m^{-1}$). Pour analyser la conséquence que cette augmentation de la libération du Ca^{2+} peut avoir, nous avons évalué la charge calcique du RS, qui était réduite, ceci pouvant ainsi réduire l'automatisme. De plus, les canaux calciques de type L du sarcolemme, aussi impliqués dans l'automatisme, sont inactivés par le calcium intracellulaire. L'analyse de ce courant par *patch-clamp* montre que les cellules isolées du NSA des souris KI ont une amplitude de courant plus faible. En revanche, cette diminution était dépendante du Ca^{2+} intracellulaire car elle disparait lorsqu'on tamponne le Ca^{2+} intracellulaire par le BAPTA.

En résumé, la mutation RyR_2^{R420Q} produit des *sparks* Ca^{2+} plus longs dans le temps, suggérant des ouvertures du canal plus longues, ce qui est directement impliqué dans la bradycardie du fait de la vidange du réservoir RS et l'inactivation des canaux calciques type L. En conséquence, les thérapies en cours d'étude qui favoriseraient la stabilisation du RyR2 à l'état fermé pourraient ne pas être efficaces, et il faudrait plutôt essayer des thérapies qui faciliteraient la fermeture du canal, une fois qu'il est ouvert.