



HAL
open science

Rôle des canaux ioniques dans les dysfonctions de l'activité du nœud sinusal

Matthias Baudot

► **To cite this version:**

Matthias Baudot. Rôle des canaux ioniques dans les dysfonctions de l'activité du nœud sinusal. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT063 . tel-02010501

HAL Id: tel-02010501

<https://theses.hal.science/tel-02010501>

Submitted on 7 Feb 2019

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Electrophysiologie cardiaque

École doctorale Sciences Chimiques et Biologie pour la Santé

Unité de recherche UMR 5203

Equipe « Physiopathologie cardiaque et cardioprotection »

ROLES DES CANAUX IONIQUES DANS LES DYSFONCTIONS DE L'ACTIVITE DU NŒUD SINUSAL

Présentée par Matthias BAUDOT

Le 05 octobre 2018

Sous la direction de Matteo Elia MANGONI

et Stéphanie BARRERE-LEMAIRE

Devant le jury composé de

Matteo Elia Mangoni, DR, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier

Stéphanie Barrère-Lemaire, DR, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier

Ana Maria Gomez, DR, INSERM, Châtenay-Malabry

Jean Marc Goillard, CR, INSERM, Marseille

Jean-Yves Le Guennec, Pr, Université de Montpellier

Flavien Charpentier, DR, Institut de thorax, Nantes

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Résumé

L'automatisme cardiaque est généré par un mécanisme fondamental partiellement compris et controversé, initié par des cardiomyocytes spécialisés dans le nœud sino-atrial (NSA). Ces cellules *pacemaker* (cNSAs) présentent une phase spontanée de dépolarisation diastolique (DD), qui mène le potentiel de membrane de la fin de la repolarisation du potentiel d'action (PA) au seuil de déclenchement du PA suivant. Cette activité spontanée implique plusieurs canaux ioniques à la surface de la membrane plasmique et la dynamique calcique intracellulaire. Les cardiomyocytes contractiles du myocarde expriment majoritairement le canal calcique $Ca_v1.2$ tandis que les cNSAs en expriment d'autres isoformes. Ce sont les canaux calciques de type L (LTCC) $Ca_v1.3$ et de type T (TTCC) $Ca_v3.1$, qui sont impliqués dans la DD. Les souris génétiquement modifiées pour $Ca_v1.3$ et/ou $Ca_v3.1$ ont des caractéristiques physiopathologiques et sont utilisées comme modèle d'étude des dysfonctions sinusales de l'homme. La cartographie optique du NSA isolé a permis de révéler une activité électrophysiologique intrinsèque altérée par les mutations. L'expérimentation en *patch clamp* et en imagerie calcique des cNSAs isolées montrent que les mutations altèrent la mécanistique cellulaire du *pacemaker*. Le couplage de ces approches à l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques a permis d'évaluer la contribution des différents éléments à cette mécanistique cellulaire et de préciser les controverses sur les fondements de l'automatisme cardiaque. Cette thématique de recherche présente des enjeux majeurs dans le domaine de la santé puisque les perspectives thérapeutiques et les stratégies pharmacologiques pour traiter les dysfonctions sinusales nécessitent une connaissance intégrale du mécanisme.

Mots clés : Nœud sinusal, pacemaker, canaux calciques, dépolarisation diastolique, souris génétiquement modifiée, électrophysiologie cardiaque.

Abstract

Role of ion channels in sino-atrial node activity dysfunction.

Heart automaticity is generated by a basic *pacemaker* mechanism not fully understood and still controversial. *Pacemaker* activity is initiated by specialized cardiomyocytes in the Sino-atrial node (SAN). The spontaneous phase of diastolic depolarization (DDP) characterizes SAN cells (SANc). This phase drives the membrane potential of SANc from the end of the repolarization to the threshold of the next action potential (AP). This spontaneous activity involves several ion channels on the plasma membrane and the intracellular dynamic of calcium. In terms of calcium channels, atrial and ventricular cardiomyocytes express mostly $Ca_v1.2$ whereas SANc express two additional isoforms. Specifically, in SANc are expressed $Ca_v1.3$ LTCC (L type Calcium channels) and the $Ca_v3.1$ TTCC (T type Calcium channels), which are activated during the DD. Genetically modified mice inactivated for $Ca_v1.3$, $Ca_v3.1$ and $Ca_v1.3/Ca_v3.1$ were generated and used as models of study of human SAN dysfunctions. In particular, we highlighted the impairment of the *pacemaker* activity in these mice by optical mapping of the intact SAN, and by *patch clamping* and calcium imaging of isolated SANc. Coupling this approaches with pharmacological tools allowed us to evaluate the contribution of the various elements constituting to the *pacemaker* mechanism. This thematic of research presents major issues in terms of public health. Indeed, we need a better understanding of the *pacemaker* mechanism to develop pharmacological strategies against SAN dysfunction.

Keywords: Sino-atrial node, calcium channels, cardiac electrophysiology, diastolic depolarization, genetically modified mouse, pacemaker.

Institut de génomique fonctionnelle

Unité de recherche UMR 5203

Equipe « Physiopathologie cardiaque et cardioprotection »

141, rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, FRANCE

Abréviations

AA : Acide arachidonique

ACh : Acétylcholine

ACTH : *Adreno Cortico Trophic Hormone*

Ad : Adrénaline

AKAP : *A-kinase anchoring protein*

AMPc /ATP: Adénosine monophosphate cyclique / triphosphate

ANP : *Natriuretic peptide*

APA : *Action potential amplitude*

APD : *Action potential duration*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

AVB : *Atrioventricular block*

A+P : Atropine + Propranolol

CaM : Calmoduline

CaMK : Calmoduline kinase

CDF : *Calcium dependent facilitation*

CDI : *Calcium dependent inactivation*

CHB : *Congenital heart block*

CICR : *Ca²⁺ -induced Ca²⁺ release*

CL : *Cycle length*

cNAV : Cellule du Nœud atrioventriculaire

CNBD : *Cyclic nucleotide-binding domain*

cNSA : Cellule du Nœud sino-atrial

CPVT : *Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.*

CT : Crista terminalis

Cx : Connexine

DAD : *Delayed After Depolarization*

DD : Dépolarisation diastolique

DHP : Dihydropyridine

DOX : Doxycycline

ECG : Electrocardiogramme

EDD : *Exponential diastolic depolarization*

EET : Acide epoxyeicosatriénoïque

ESC : Embryonic stem cell

FA : Fibrillation atriale

FP : Fibres de Purkinje

GIRK : *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel*

GMPc/GTP : Guanosine monophosphate cyclique/ triphosphate

GYG : Pore glycine-tyrosine-glycine

HCN : *Hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotid*

ICV : *Inferior cava vena*

IP : Intrapéritonéale

iPSC : induced Pluripotent stem cell

ISO : Isoprénaline

ISR : Isradipine

IST : *Inappropriate sinus tachycardia*

IVA : Ivabradine

KO : *Knockout*

LCICR : *Local Ca²⁺ -induced Ca²⁺ release*

LCR : *Local Ca²⁺ release* (libération localisée de Ca²⁺) appelé aussi « *Sparks* »

LTCC / HVA: *L-type calcium channel / High voltage activation*

M₂ : Récepteur muscarinique

M clock : *Membrane clock*

MNT : modèle Mc Allister-Noble-Tsien

MSC : *Mesenchymal stem cell*

Nad : Noradrénaline

NAV : Nœud atrioventriculaire

NCX : Echangeur Na⁺ / Ca²⁺

NF-M : Neurofilament

NO : *Nitric oxide*

NSA : Nœud sino-atrial

PA : Potentiel d'action

PDEII : Phosphodiesterase 2

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5 biphosphate

PKA ! Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKI : *Protein kinase inhibitor*

PMCA : *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*

PP : Protéine phosphatase

PSC : Pluripotent stem cell

RS : Réticulum sarcoplasmique

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SANDD : *Sinoatrial node dysfunction and deafness*

SCV: *Superior cava vena*

SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

SK : *Small K⁺ conductance (channel)*

SSS : *Sick sinus syndrome*

SWD : *Spike-and-wave discharges*

TBX: T-box

THA : Tetrahydroacridine

TRPM : *Transient receptor potential melastatin*

tTA : Tetracycline

TTCC / LVA: *T-type calcium channel / Low voltage activation*

TTX : Tétrodoxine

VDCC : *Voltage dependant calcium channel*

VDF : *Voltage dependent facilitation*

VDI : *Voltage dependent inactivation*

WT : *Wild type*

Valorisation des travaux de recherche

Les travaux effectués au cours de ces 4 années de doctorat font l'objet d'un article qui sera soumis à publication. Les résultats ont également été présentés lors de congrès nationaux et internationaux et des colloques scientifiques sous forme de présentations orales ou de posters. Plusieurs collaborations sur d'autres projets au sein et en dehors de l'institut ont été effectuées. Et des formations scientifiques théoriques et pratiques complètent mon doctorat.

Communications orales

“Etude fonctionnelle des canaux ioniques dans la génération de l'automatisme cardiaque.”

Patch club 2018, 06/18, Montpellier, France

“Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type Cav1.3 and T-type Cav3.1 channels.”

European days of the French society of cardiology (JESFC), 01/17, Paris, France.

Reflexion Group on Cardiovascular Research (G.R.R.C.), 04/17, Nantes, France.

LabEx meeting, 12/17, Lille, France.

“Ion channels in Sick Sinus Syndrome (SSS) / Sinoatrial Node dysfunction (SND).”

Séminaire interne à l'IGF, 11/16, Montpellier, France.

“Canaux calciques et dysfonctionnement du mécanisme *pacemaker*.”

Patch club, 06/16, Montpellier, France.

“Ion channels and dysfunction of the pacemaker mechanism.”

Séminaire interne à l'IGF, 11/15, Montpellier, France.

Présentations poster

“Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels.”

European days of the French society of cardiology (JESFC), 01/17, Paris, France.

Reflexion Group on Cardiovascular Research (G.R.R.C.), 04/17, Nantes, France.

ESC congress, European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology (E.W.G.C.C.E.), 06/17, Vienna, Austria.

28th Ion channel meeting and 6th SFICT Workshop, 09/17, Sète, France.

“L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ calcium channels in cardiac pacemaker activity.”

ESC congress, European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology

(E.W.G.C.C.E.), 09/16, Glasgow, Scotland.

LabEx Young researchers meeting, 10/16, Nice, France.

Prix et distinctions

Prix pour la présentation poster de “Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels.”

28th Ion channel meeting and 6th SFICT Workshop, 09/17, Sète, France.

Bourse de voyage pour le résumé de “Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels.”.

ESC congress, European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology

(E.W.G.C.C.E.), 06/17, Vienna, Austria.

Second prix de la compétition des jeunes chercheurs pour la présentation de “Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels.”

European days of the French society of cardiology (JESFC), 01/17, Paris, France.

Abstract : Heart automaticity in mice lacking “pacemaker” L-type Ca_v1.3 and T-type Ca_v3.1 channels.

*M. Baudot*¹, P. Mesirca¹, I. Bidaud¹, J. Roussel¹, A. Torrente¹, L. Talssi¹, S. Laarioui¹, H.S. Shin², J. Striessnig³, J. Nargeot¹, S. Barrère-Lemaire¹, M.E. Mangoni¹.*

¹IGF - CNRS, Montpellier, France ; ²Korea institute of science and technology, Seoul, South Korea ; ³Institute of Pharmacy, Innsbruck, Austria.

Background: Pacemaker myocytes of the sino-atrial node (SAN) generate heart automaticity. These cells express a specific set of ion channels involved in pacemaking, including L-type Ca_v1.3, T-type Ca_v3.1 Ca²⁺ channels, “funny” f(HCN) and tetrodotoxin (TTX) sensitive Na⁺ channels. The degree of functional redundancy of these channels in SAN automaticity and impulse conduction has not been investigated directly. We thus studied automaticity in mice lacking both Ca_v1.3 and Ca_v3.1 channels (Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}) expressing only the ubiquitous Ca²⁺ channel isoform Ca_v1.2. We attempted to unravel associations between ion channels needed for proper SAN pacing. **Methods & Results:** Channel loss-of-function reduced the basal heart rate (HR) of knockout mice: Ca_v1.3^{-/-} (≈30 %), Ca_v3.1^{-/-} (≈10 %) and Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} (≈30 %), compared to control mice (*WT*). We did not observe atrioventricular blocks (AVBs) in *WT* and Ca_v3.1^{-/-}, but these were present in Ca_v1.3^{-/-} and Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} mice, indicating an important role of Ca_v1.3 in impulse conduction. In these mice, inhibition of the autonomic nervous system (ANS) input by co-injection of atropine (0.5 mg/Kg) and propranolol (5 mg/Kg) decreased both HR and AVBs, indicating that ANS activity contributed to dysfunction of heart automaticity. Administration of the f(HCN) channel blocker Ivabradine (6 mg/kg) similarly reduced HR of about 50 % in the aforementioned genotypes without stopping automaticity. In Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} Langendorff-perfused hearts, we observed a complete dissociation between atrial and ventricular rhythms. Perfusion of Ivabradine (10 μM) slowed SAN rate in Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} mice and prevented rhythm dissociation. Concurrent inhibition of HCN and TTX-sensitive Na⁺ channels reduced HR in all genotypes by 78 %, slowing HR of Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} SAN myocytes decreases their pacemaker rate up to 25 bpm. **Conclusion:** Our results show that combined ablation of Ca_v1.3 and Ca_v3.1 Ca²⁺ channels strongly impairs cardiac automaticity. Although other mechanisms maintain slow pacemaker activity after genetic ablation and pharmacologic inhibition of membrane bound pacemaker ion channels our findings indicate that following concurrent Ca_v1.3 and Ca_v3.1 loss heart automaticity and impulse conduction cannot cope with autonomic nervous system activity.

Formation dans le cadre du doctorat

- Formation « expérimentation animale - niveau chirurgie », Marseille, 2015. (40h)
- Formation « expérimentation animale - niveau 1 concepteur », Marseille, 2015. (40h)
- Doctoriales Languedoc-Roussillon, Sète, 2016. (25h)
- Formation « dépôt électronique des thèses », Montpellier, 2018. (3h)

Affiliation

Je suis membre des Sociétés française et européenne de cardiologie depuis 2014 dans laquelle je participe, notamment avec le groupe de travail d'électrophysiologie cellulaire cardiaque (E.W.G.C.C.E.) et le groupe de réflexion sur la recherche cardiovasculaire (G.R.R.C.).

Table des matières

Résumé	3
Abréviations	5
Valorisation des travaux de recherche	9
Communications orales	9
Présentations poster	10
Prix et distinctions	10
Formation dans le cadre du doctorat	12
Affiliation	12
Table des matières	13
INTRODUCTION	19
Partie I: Physiologie cardiaque et centres rythmogènes	19
I.1 Histologie, régulation et fonction cardiaque	20
I.1.1 Histologie du muscle cardiaque	20
I.1.2 Circulation sanguine	22
I.1.3 Régulation par le système nerveux autonome	24
I.1.4 Organisation des cellules cardiaques	28
I.1.5 Couplage excitation-contraction	30
I.2 Centres rythmogènes de l'automatisme cardiaque	32
I.2.1 Organisation du tissu <i>pacemaker</i>	32
I.2.2 Structure, organisation et particularités du NSA	33
Structure du NSA	33
Différenciation du NSA central et de la zone paranodale	35
Couplage histologie-électrophysiologie autour du NSA	38
Conduction du signal	40
I.2.3 Le NAV, le second centre rythmogène	42
I.2.4 Dysfonction à l'origine du <i>Sick sinus syndrome</i>	44
	13

I.3 Lecture d'électrocardiogramme (ECG)	46
I.3.1 Ondes et activité cardiaque	46
I.3.2 Dysfonctions du rythme cardiaque et ECG chez l'homme	49
Partie II : Mécanisme fondamental de l'automatisme cardiaque	53
II.1 Génération de l'automatisme par le nœud sinusal	54
II.1.1 Bases d'électrophysiologie cellulaire	54
II.1.2 Caractéristiques différentielles du PA sinusale	56
II.2 Histoire de l'électrophysiologie cardiaque	60
II.2.1 « <i>De naturali parte medicinae</i> » de J. Fernel	60
II.2.2 « <i>The surprising heart</i> » de Denis Noble	62
II.2.3 « <i>Funny current</i> », I_f de D. DiFrancesco	66
II.2.4 Discrimination d' $I_{Ca,T}$ et d' $I_{Ca,L}$ de N. Hagiwara	68
II.2.5 Emergence de deux concepts/modèles de l'origine de l'automatisme cardiaque	70
II.3 Controverse entre « M clock » et « Ca^{2+} clock »	71
II.3.1 « <i>Membrane clock</i> »	71
II.3.2 « <i>Ca²⁺ clock</i> »	72
Partie III : Caractéristiques fonctionnelles des canaux ioniques et pathologies associées	75
III.1. I_{Na}	76
III.2 Etude fonctionnelle d' I_f	78
III.2.1 Caractéristiques d' I_f	78
Propriétés	78
Structure	78
Expression des canaux HCN dans le cœur adulte	80
Modulation d'HCN	82
III.2.2 Dysfonction génétique chez l'homme	84
III.2.3 L'ivabradine	86
III.2.4 Souris génétiquement modifiée	87
III.3 Les canaux calciques voltage-dépendants	89

III.3.1 Caractéristiques des VDCC	89
Propriétés des LTCC	90
Structure des LTCC	90
Expression des LTCC	92
Propriétés des TTCC	93
Structure des TTCC	93
Expression des TTCC	93
Modulation	94
Protéines de phosphorylation	94
Sensibilité au voltage	95
Dépendance au Ca^{2+}	97
III.3.2 Dysfonction génétique chez l'homme	98
III.3.3 Souris génétiquement modifiées pour les VDCC	100
Souris <i>knockout</i> $Ca_v1.3^{-/-}$	100
<i>Quel est le rôle de $Ca_v1.2$ dans le pacemaker lorsque $Ca_v1.3$ est inactivé?</i>	103
<i>Pourquoi des cNAVs de $Ca_v1.3^{-/-}$ ne génèrent plus d'activité spontanée ?</i>	107
Souris <i>Knockout</i> $Ca_v3.1^{-/-}$	108
Lignée KO $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$	112
III.3.4 Interaction entre $Ca_v1.3$ et le RyR2/NCX	115
Mutation de RyR2	115
Réduction de l'activité de l'échangeur NCX	116
L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire influence les canaux K^+ repolarisants	118
$Ca_v1.3$ dans la synchronisation des LCR	119
III.3.5 Contribution de $Ca_v1.3$ sur I_{st} (« sustained inward current »)	123
Partie IV : De la recherche fondamentale aux perspectives thérapeutiques	124
IV.1 Etat de l'art des traitements contre les pathologies du NSA	125
IV.1.1 Les pacemakers/stimulateurs électroniques	126
IV.1.2 Génération d'un <i>pacemaker</i> biologique	127

Thérapies géniques _____	129
Thérapies cellulaires _____	131
<i>Que manque-t-il au pacemaker biologique pour être développé ?</i> _____	133
IV.2 Nouveau concept du « ciblage compensatoire du canal» _____	134
PROBLEMATIQUE _____	137
MATERIELS ET METHODES _____	139
Modèles animaux _____	139
Enregistrement télémétrique des ECG <i>in vivo</i> _____	140
Implantation des transmetteurs en sous-cutané _____	140
Enregistrement des ECG <i>in vivo</i> _____	142
Analyse des ECG <i>in vivo</i> _____	143
Enregistrement d'ECG de cœur isolé en système Langendorff _____	144
Prélèvement du cœur _____	144
Montage de cœur isolé sur le système Langendorff et acquisition _____	146
Analyse des ECG <i>ex vivo</i> _____	147
Cartographie optique du nœud sinusal _____	149
Préparation du tissu sinusal isolé _____	149
Traitement du tissu sinusal isolée par un indicateur de voltage _____	150
Acquisition de la fluorescence du tissu sinusal isolé _____	150
Analyse de l'activité électrophysiologique du nœud sinusal _____	151
<i>Patch clamp</i> sur cellule isolée du NSA _____	152
Préparation de la culture primaire de cellules isolées du nœud sinusal (cNSAs) _____	152
Acquisition en « Current clamp » configuration patch perforé _____	153
Analyse de l'activité électrophysiologique des cellules du nœud sinusal _____	154
Imagerie calcique en microscopie confocale _____	155
Marquage du calcium intracellulaire des cellules du nœud sinusal _____	155
Acquisition en microscopie confocale en configuration « <i>line scan</i> » _____	155
Analyse de la fluorescence des cellules du nœud sinusal _____	156

Statistiques	157
RESULTATS	158
1. L'ablation génétique de Cav1.3 et Cav3.1 altèrent l'automatisme cardiaque.	160
2. Effet de l'Ivabradine sur l'activité cardiaque de Cav1.3 ^{-/-} /Cav3.1 ^{-/-} .	162
3. L'activité cardiaque de Cav1.3 ^{-/-} /Cav3.1 ^{-/-} <i>ex vivo</i> est désynchronisée.	164
4. Les ablations génétiques désynchronisent l'activité du nœud sinusal.	166
5. L'addition des inhibitions d'I _f , d'I _{Na TTX-sensitive} et de l'ablation de Cav1.3 supprime l'activité spontanée du nœud sinusal.	168
6. Les inhibitions concomitantes d'I _f et d'I _{Na TTX-sensitive} et l'ablation de Cav1.3 suppriment l'activité spontanée dans les cellules du nœud sinusal.	170
7. Les LCRs dans les cNSAs ne sont pas synchronisés avec l'activité <i>pacemaker</i> .	172
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	174
8. Caractéristiques de l'activité cardiaque <i>in vivo</i> .	175
9. Paramètres de l'activité dans le tissu sinusal enregistrée en cartographie optique sous perfusion d'IVA 10 μM et de TTX 100 nM.	176
10. Tableau de l'évolution des dysfonctions observées dans les NSA isolés en cartographie optique.	177
11. Paramètres des potentiels d'action enregistrés en <i>patch clamp</i> sur les cNSAs isolées.	178
12. Pentas de la DD et fréquence de PA sous l'effet de l'ISO dans les cNSAs isolées.	179
13. Amplitude des transitoires calciques enregistrée dans les cNSAs isolées	180
14. ECGs enregistrés sur un coeur <i>WT</i> par comparaison avec des cœurs Cav1.3 ^{-/-} /Cav3.1 ^{-/-} sur le système Langendorff	181
15. Illustration des foyers de dépolarisation et de la conduction sur des cartes d'activation du tissu sinusal.	182
16. Images et tracés de l'activité calcique dans les cNSAs isolées enregistrées en microscopie confocale.	183
DISCUSSION	184
Effet des ablations des canaux calciques sur l'automatisme cardiaque.	184
Dysfonctions des centres rythmogènes Cav1.3 ^{-/-} /Cav3.1 ^{-/-}	186
Dans ce modèle double mutant dénué des deux VDCC de la DD, à quoi correspond l'activité résiduelle du <i>pacemaker</i> ?	188

Le modèle du Ca ²⁺ clock est désuet. _____	189
CONCLUSION _____	190
ANNEXES _____	192
Table des figures et des résultats _____	192
Références bibliographiques _____	201
Publications et collaboration _____	213
« Ciblage du canal compensatoire », P. Mesirca et collaborateurs, PNAS 2016. _____	213
« Ciblage du canal compensatoire », P. Mesirca et collaborateurs, AVCC 2018. _____	223
A.G. Torrente, L. Fossier, M. Baudot et collaborateurs, Cardiovascular Research 2018. ____	226
P. Mesirca et collaborateurs, Nature Communication, 2018. _____	257
Publication à venir _____	287

INTRODUCTION

Partie I: Physiologie cardiaque et centres rythmogènes

Le cœur est un organe essentiel composé d'un tissu musculaire (myocarde) et d'un tissu électrogène dont la mécanistique et les pathologies sont présentées dans ce manuscrit. Les bases anatomiques et fonctionnelles pour la compréhension de la physiologie cardiaque sont détaillées dans cette première partie. Mon travail de thèse s'est focalisé sur l'activité du nœud sinusal qui guide l'automatisme cardiaque, ses caractéristiques différentielles, sa morphologie et les pathologies qui sont associées à son dysfonctionnement. Les souris knockout (KO) utilisées dans notre étude présentent une activité cardiaque dysfonctionnelle. L'interprétation de leurs électrocardiogrammes nécessite un œil expert, et révèle des troubles du rythme issus de dysfonctionnements cardiaques observés sur des électrocardiogrammes de personnes atteintes de cardiopathies.

I.1 Histologie, régulation et fonction cardiaque

I.1.1 Histologie du muscle cardiaque

Le cœur est un organe contractile essentiellement composé de muscle soutenu dans la cavité thoracique par le péricarde. Chez les vertébrés supérieurs, il est divisé en deux moitiés, droite et gauche, chacune comportant deux cavités, l'oreillette et le ventricule. Les cavités auriculaires et ventriculaires d'un même côté du cœur communiquent entre elles, mais les chambres droites ne communiquent pas directement avec les chambres gauches. Elles sont séparées par une paroi appelée septum qui empêche le mélange de sang oxygéné et non oxygéné. Les deux côtés du cœur fonctionnent néanmoins de façon synchrone.

Les oreillettes servent de réservoirs temporaires au sang avant qu'il ne passe dans les ventricules. Elles s'insèrent dans la masse musculaire des ventricules, plus puissante pour générer une forte propulsion du sang dans le système vasculaire. Le muscle cardiaque est un tissu hermétique, composé de trois feuillets qui sont de l'extérieur vers l'intérieur :

- l'épicarde, qui assure la protection et l'amarrage du cœur dans le médiastin ;
- le myocarde, qui constitue la partie musculaire du cœur ;
- l'endocarde, qui est composé d'un endothélium qui tapisse les cavités cardiaques en contact avec le sang.

Le tissu qui nous intéresse plus particulièrement est le tissu spécialisé appelé « cardionecteur », « électrogène » ou encore « conducteur » dont la fonction est d'assurer l'automatisme cardiaque. Il s'étend des oreillettes aux ventricules. Il est composé de nœuds et de fibres qui se ramifient pour englober la totalité du cœur et assurer la conduction du signal électrique dans l'ensemble du tissu cardiaque. Dans l'oreillette droite, le nœud sinusal (NSA) et le nœud atrioventriculaire (NAV) sont les centres rythmogènes de l'automatisme. Dans la paroi interventriculaire, les deux branches du faisceau de His assurent la conduction du signal électrique et se ramifient en fibres de Purkinje (FP) (Figure 1).

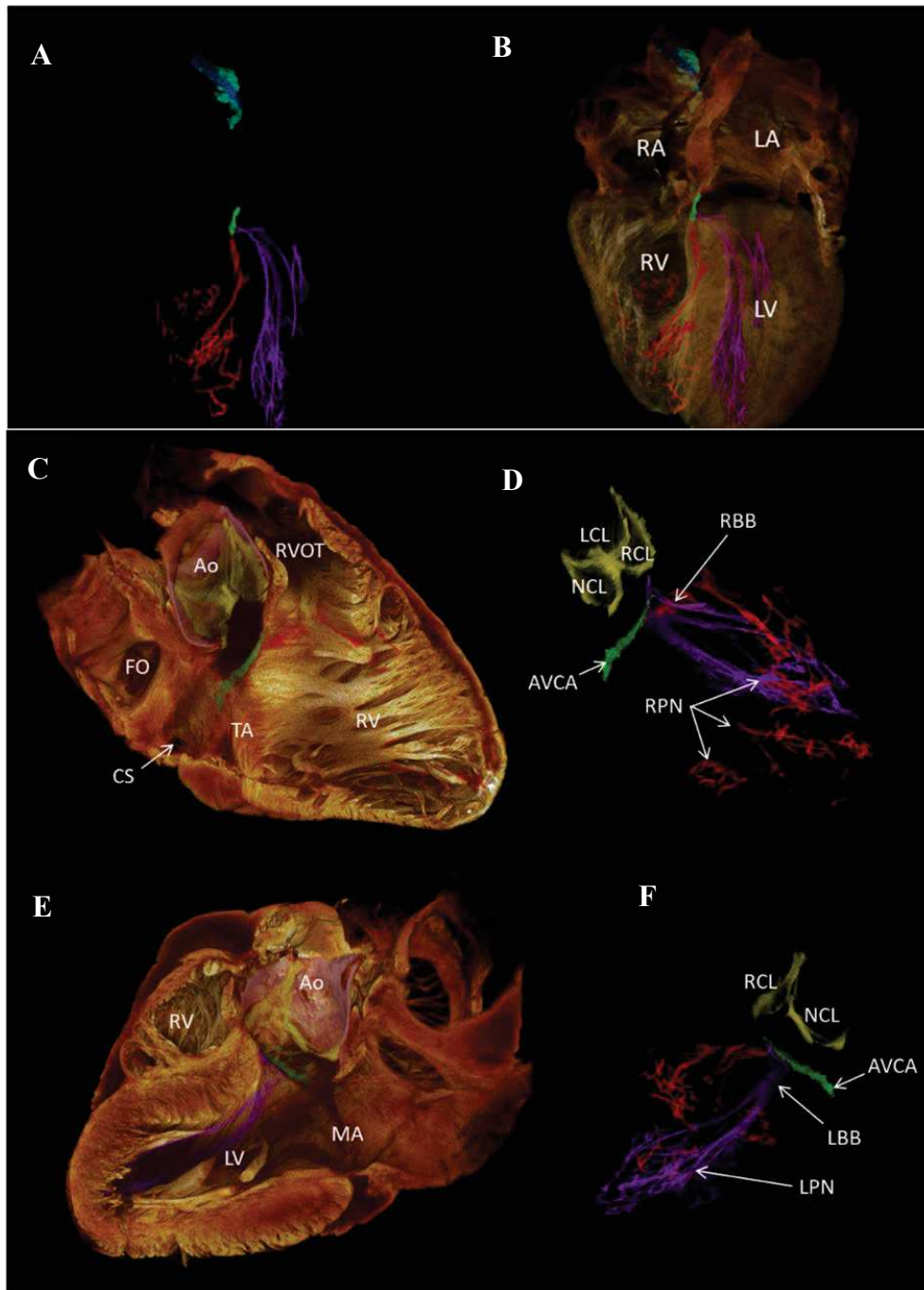


Figure 1: Images tridimensionnelles du coeur humain et du système de conduction mis en évidence par micro tomographie informatisée (micro-CT). B: Les 4 cavités cardiaques sont les oreillettes droite (RA) et gauche (LA) et les ventricules droit (RV) et gauche (LV). A, D, F: Le tissu conducteur du cœur entier, dans l'ordre de la conduction : le nœud sinusal central (bleu) et la zone paranodale (turquoise), l'axe de la conduction à travers le nœud atrioventriculaire (AVCA, vert), la branche droite du faisceau de His (RBB, rouge) qui se ramifie en réseau de Purkinje (RPN) et la branche gauche du faisceau de His (LBB ; violet) qui se ramifie en Purkinje également (LPN). C, D, E & F: Relation anatomique entre la racine de l'aorte (Ao) et la charnière du réseau coronarien gauche (LCL), droit (RCL) et non coronarien (NCL). D'autres éléments sont mis en évidence sur ces coupes : l'anneau de la valve mitrale (MA) et tricuspide (TA), la voie d'éjection ventriculaire droite (RVOT), la fosse ovale (FO) et le sinus coronarien (CS). D'après Stephenson et al. 2017

I.1.2 Circulation sanguine

La fonction cardiaque première est de faire circuler le sang à travers le réseau artériel afin d'alimenter l'organisme en dioxygène (O_2) et nutriments, et le réseau veineux. La contraction du muscle cardiaque ventriculaire permet d'éjecter le sang dans la circulation sanguine *via* l'aorte. Durant cette phase, les oreillettes se relaxent et se rechargent de sang, c'est la diastole auriculaire. A leur tour, les ventricules se relaxent, se rechargent en sang, c'est la diastole ventriculaire. Durant la diastole, les fibres musculaires se repolarisent à leur stade initial, prête pour un nouveau cycle de contraction cardiaque.

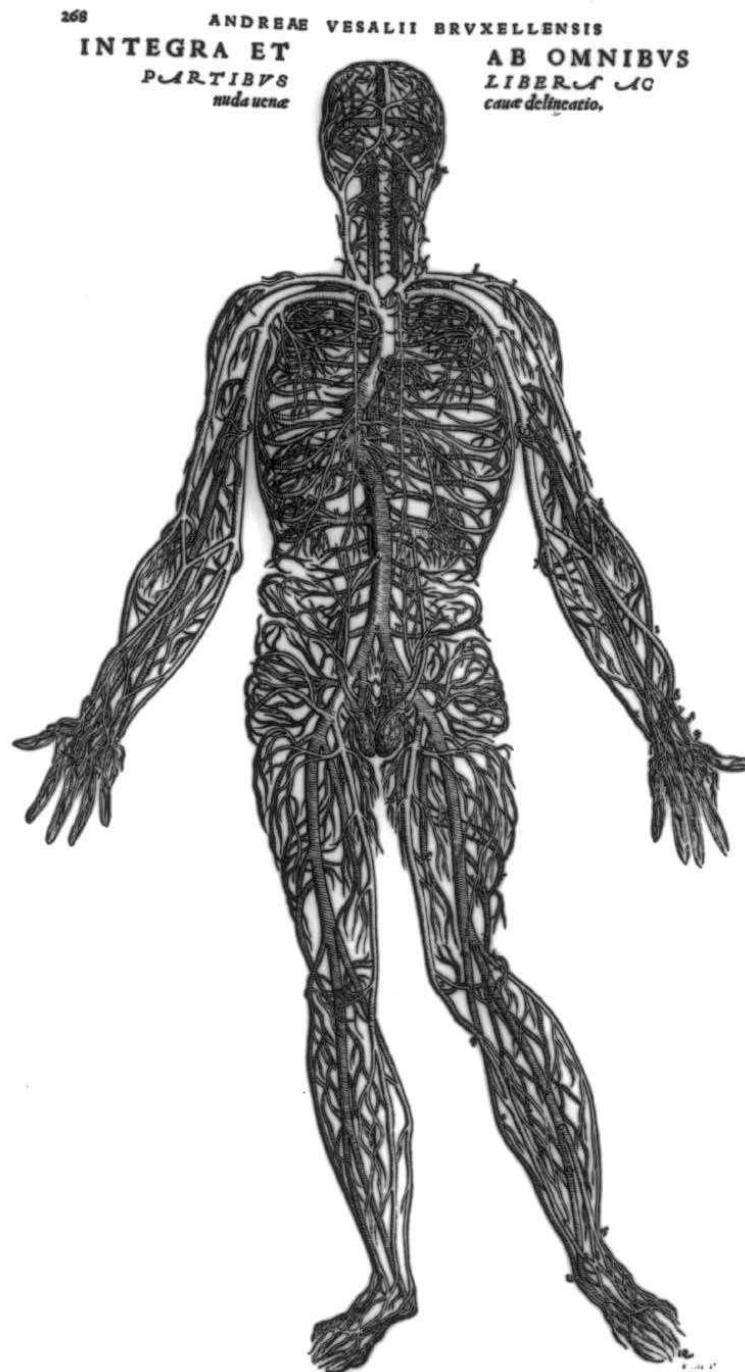
Le sang traverse plusieurs structures anatomiques des veines systémiques aux artères systémiques de manière cyclique :

- 1 - il arrive pauvre en oxygène des veines caves supérieure et inférieure dans l'oreillette droite qui l'expulse dans le ventricule droit,
- 2 - à la contraction du ventricule droit, le sang est expulsé vers la circulation pulmonaire en passant successivement par les artères, les artérioles puis les capillaires où il se recharge en O_2 ,
- 3 - chargé en O_2 , le sang retourne au cœur par les canaux du système cardiovasculaire *via* les veinules et veines pulmonaires jusqu'à l'oreillette gauche puis le ventricule gauche,
- 4 - le sang riche en O_2 est expulsé du ventricule gauche dans l'organisme par l'aorte, se charge en nutriments et alimente les muscles et les organes de la tête au pied.

La force motrice du sang responsable de son écoulement provient uniquement de la contraction du muscle cardiaque. La circulation sanguine est monosémique grâce à des valves auriculo-ventriculaires et des valvules sigmoïdes pulmonaires et aortiques au niveau du cœur, empêchant le reflux sanguin lors de la diastole. Un ensemble de valves est également présent dans les veines pour que le sang remonte efficacement des pieds jusqu'au cœur.

Le cœur reçoit son irrigation sanguine par des branches artérielles appelées artères coronaires qui prennent naissance dans le creux des valvules sigmoïdes aortiques. Ces coronaires circulent à la surface du cœur puis plongent dans l'épaisseur du tissu en se ramifiant pour une irrigation totale du myocarde. Les artères coronaires les plus importantes sont : l'artère coronaire droite, l'artère coronaire principale gauche, l'artère descendante antérieure gauche et l'artère circonflexe. Le retour du sang pauvre en O_2 et de ses nutriments se fait par les veines

coronariennes qui affluent au niveau du sinus coronarien ouvert dans l'oreillette droite. Le sang passe ensuite dans la circulation pulmonaire où il est ré-oxygéné.



Dessin de la circulation sanguine à gauche. Vésale (1514-1564), médecin de Charles Quint publie "De corporis humani fabrica" en 1543 relatant ses travaux de dissection dont les dessins sont attribués à Titien.

I.1.3 Régulation par le système nerveux autonome

Bien que le cœur soit doué d'automatisme, il est toutefois régulé par le système nerveux autonome (SNA) composé du système (ortho-) sympathique (+) et du système parasympathique (-) (Figure 3). La régulation de l'activité du muscle cardiaque est un équilibre entre le tonus vagal, qui ralentit la fréquence des battements du cœur et le tonus du nerf sympathique qui l'accélère. Cette balance se déséquilibre d'un côté comme de l'autre en fonction des besoins de l'organisme et varie selon les espèces. Par exemple, la « flight-or-flight response » est une réaction physiologique animale en état d'alerte ou de stress qui correspond à la sécrétion d'ACTH (Adréno Cortico Trophic Hormone) de la glande pituitaire, activée en amont par l'amygdale et l'hypothalamus. L'ACTH circulant dans le sang stimule le système sympathique *via* la sécrétion secondaire de catécholamines et de cortisol des glandes surrénales qui accélèrent la fréquence cardiaque. L'accélération de la fréquence cardiaque et par conséquent du débit sanguin, augmente l'apport en O₂ et en nutriments aux muscles et organes pour conditionner l'organisme à une activité maximale.

La transduction cellulaire et tissulaire de l'activation de la voie sympathique est effectuée par la noradrénaline (Nad) libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques et l'adrénaline (Ad) sécrétée dans la circulation sanguine par les glandes surrénales. Ces molécules interagissent avec les récepteurs adrénergiques couplés à des protéines G en intracellulaires.

L'activation des récepteurs α_1 et β_2 au niveau des vaisseaux favorise la vasoconstriction et l'apport en O₂ au cœur et aux muscles.

Localisés au niveau cardiaque et rénal, les récepteurs β_1 sont couplés à des protéines G_s stimulatrices de l'adénylate cyclase pour la synthèse d'AMPc (Figure 2). Leur stimulation induit un renforcement de la force de contraction du myocarde (inotrope), l'augmentation de la fréquence cardiaque (chronotrope), de la vitesse de conduction de l'influx nerveux dans le tissu musculaire (dromotrope) et de l'excitabilité cardiaque (bathmotrope).

A l'opposé, l'acétylcholine (ACh) est le neurotransmetteur libéré par les terminaisons nerveuses parasympathiques qui induit les effets inotrope, chronotrope, dromotrope et bathmotrope négatifs suite à l'activation des récepteurs muscariniques (M₂).

Globalement, les voies de régulation agissent sur l'activité de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de protéines G (Figure 2). L'adénylate cyclase convertit l'ATP en AMPc dans

le milieu intracellulaire. L'augmentation de l'AMPc par la voie β -adrénergique favorise l'activité des éléments de l'automatisme. Soit de manière directe, grâce à l'affinité de l'AMPc sur le domaine CNBD des canaux f-(HCN), son interaction augmente la probabilité d'ouverture du canal de manière directe grâce à un déplacement de son seuil d'activation. Soit de manière plus indirecte, l'interaction se fait à travers des cascades de signalisation par des protéines de phosphorylation comme la PKA (DiFrancesco and Mangoni 1994).

La voie parasympathique diminue l'activité de l'adénylate cyclase et favorise l'hydrolyse de l'AMPc. En parallèle, elle active par des protéines G des canaux potassiques rectifiant (GIRK1/GIRK4) responsables d'un courant appelé $I_{K_{ACh}}$ (DiFrancesco, Ducouret et al. 1989). Cette régulation négative est complétée par la voie de signalisation du monoxyde d'azote (NO) avec le récepteur à l'Adénosine A_1 (Han, Shimoni et al. 1994) Elle stimule une cascade de signalisation par la production de NO qui active l'enzyme guanylate cyclase, convertissant le GTP en GMPc. Le GMPc favorise l'hydrolyse de l'AMPc *via* l'activation de la PDEII, on obtient par conséquent une diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA) (Matthes, Yildirim et al. 2004).

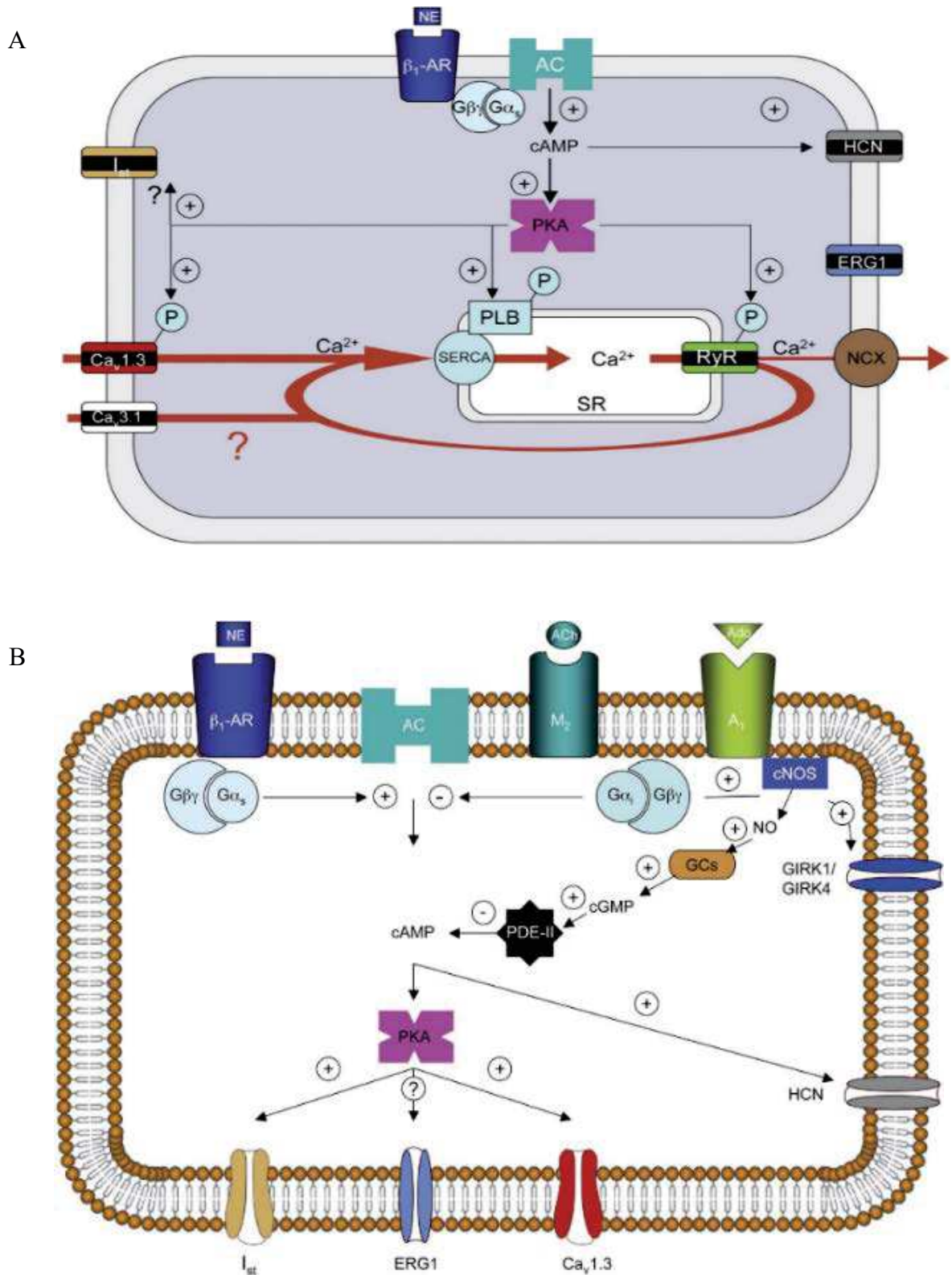


Figure 2 : Schémas des voies de régulation adrénergique, muscarinique et de l'adénosine sur l'AMPc dans l'automatisme d'une cellule du NSA. A : La voie β -adrénergique active la production d'AMPc qui favorise l'ouverture des canaux ioniques dépendants du voltage directement ou via la PKA. La PKA active également les composants de la dynamique calcique du réticulum sarcoplasmique. B : Voies de signalisation muscarinique soutenue par la voie de l'Adénosine. D'après Mangoni et Nargeot, 2008.

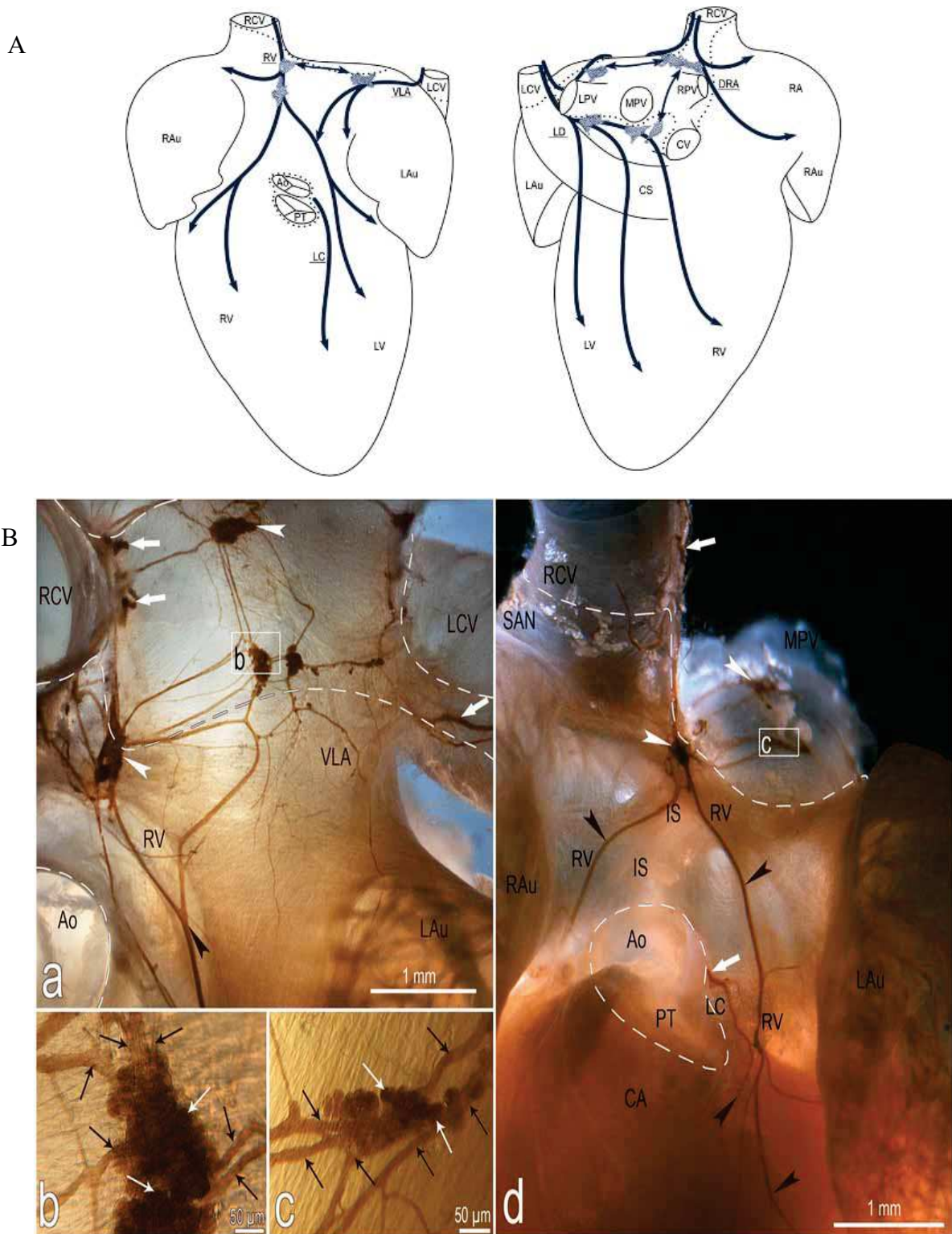


Figure 3: Innervation du cœur. Marquage histochimique de l'acétylcholine estérase (AChE) qui permet de mettre en évidence l'innervation du cœur chez la souris dont l'organisation est similaire à l'homme. A : Schéma de la distribution et de la morphologie des principales voies nerveuses et ganglions. B : (a et b) Macrophotographies qui montrent le réseau du système nerveux (têtes de flèches noires) et les ganglions (têtes de flèches blanches) au niveau atrial. (b et c) Zooms réalisés sur des ganglions où les petites flèches noires montrent les nerfs interganglionnaires et les blanches les neurones des ganglions. D'après Rysevaite K. et al., 2011.

I.1.4 Organisation des cellules cardiaques

La cellule musculaire cardiaque, appelée aussi cardiomyocyte, est de type striée. Elle est constituée de filaments épais de myosine et de fins filaments d'actine comme dans le muscle squelettique. En revanche, sa morphologie est différente car les cardiomyocytes sont considérablement plus courts que les fibres squelettiques, qui sont longues et cylindriques.

Le cœur est un syncytium, qui permet la synchronisation de la contraction de toutes les fibres. Pour optimiser la synchronisation, les cardiomyocytes présentent de fortes connexions entre eux. Des prolongements de cellules adjacentes se joignent à leurs extrémités au niveau de zones de fusion composées de disques intercalaires. Ces disques contiennent des desmosomes qui assurent le lien entre les cellules ainsi que des jonctions communicantes qui favorisent la propagation du signal d'une cellule à une autre.

Il existe plusieurs types de cardiomyocytes adaptés à leurs fonctions : les cardiomyocytes contractiles sont riches en myofibrilles pour assurer la contraction, les myoendocrines sécrètent le facteur natriurétique auriculaire¹ pour la baisse de la pression artérielle, et les cellules cardionectrices dites aussi « *pacemaker* » ont la capacité de générer et de conduire un signal électrique. Ce dernier type de cellule compose principalement les centres rythmogènes (NSA et NAV). Elles ont une taille variable d'une dizaine de micromètre de longueur et une forme plus fine et allongée que le myocarde (Figure 4) (Verheijck, Wessels et al. 1998).

¹ ANP : « Atrial natriuretic peptide ».

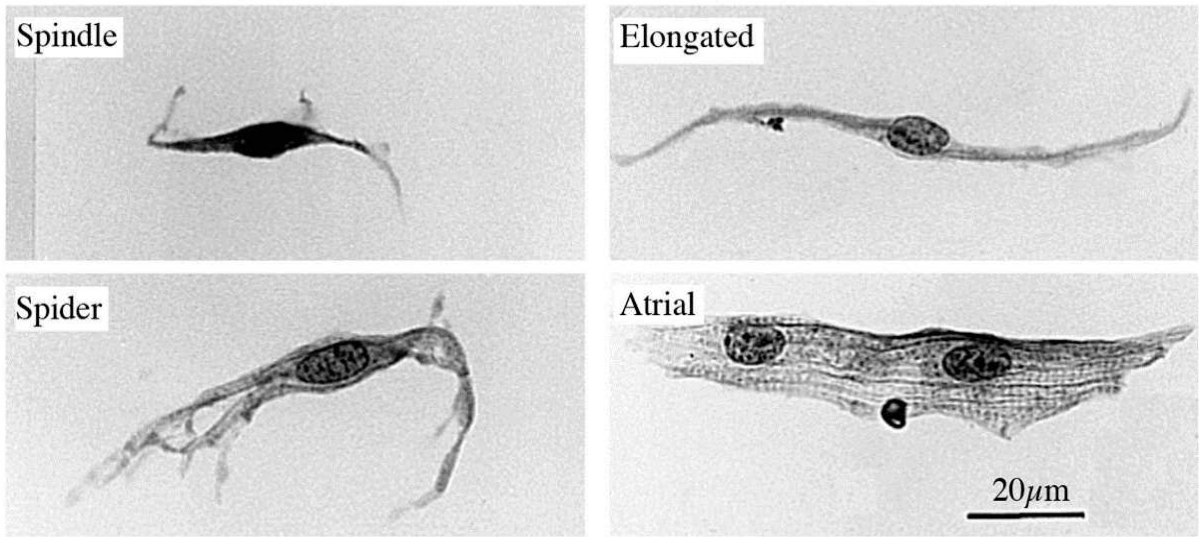


Figure 4 : Photographies des différents types de cNSA chez le lapin. D'après Verheijck et al., 1998.

I.1.5 Couplage excitation-contraction

On appelle couplage excitation-contraction le processus qui convertit le signal électrique et l'élévation du niveau de Ca^{2+} en phénomènes mécaniques (contraction de la cellule musculaire). La première phase, l'excitation, débute par une entrée de Ca^{2+} via des canaux calciques de type L dans la cellule qui induit l'ouverture du récepteur à la Ryanodine (RyR) à la surface du réticulum sarcoplasmique (RS) pour la sortie d'une plus grande quantité de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire.

Dans un deuxième temps, la contraction utilise ce Ca^{2+} pour l'association actine-myosine. En présence d'une forte concentration de Ca^{2+} intracellulaire, l'inhibition de protéines régulatrices est levée et les ponts de myosine sont activés et s'unissent pour la contraction du muscle. Cette modulation par le Ca^{2+} entrant dans la cellule sur la libération du stock calcique du RS est un phénomène appelé « *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release* » (CICR, Figure 5).

Pour limiter le temps de contraction, le Ca^{2+} est pompé lentement dans le RS par la pompe SERCA. Le RS est particulièrement développé dans les cardiomyocytes et leur métabolisme est adapté à l'endurance, nécessitant constamment une production d'ATP.

Dans ce mécanisme, le RyR est un complexe macromoléculaire finement régulé et le Ca^{2+} joue un rôle clé dans la signalisation par l'activation des éléments et l'amplification du signal. Le RyR est sélectif au Ca^{2+} et au K^+ (ratio 7/1). La Ryanodine à faible concentration bloque le canal à l'état ouvert, créant une déplétion de Ca^{2+} du RS et un arrêt du couplage. D'où l'utilisation de cet extrait de plante *Ryania* comme poison historique, causant la mort par tétanie.

La régulation du RyR est complexe (Bers 2004) : il possède un site de phosphorylation pour la PKA, la CAMKII δ et des phosphatases PP1 et PP2A ; il est associé à des protéines de manière directe ou indirecte comme la Calstabine pour la stabilisation du Ca^{2+} , la Sorcine, la Calmoduline (CaM), Homer, l'Histidine enrichie en Ca^{2+} , la Triadine, la Junctine, la Calsequestrine ; il est également sensible à l'oxydation et la nitrosylation. Une dysfonction de cette régulation engendre des fuites de Ca^{2+} du RS et dérègle l'homéostasie calcique, enrayant ainsi le mécanisme cellulaire et causant des pathologies de type dystrophie musculaire (voir la revue (Santulli, Lewis et al. 2017)). Parmi les 3 isoformes de RyR 1, 2 et 3, RyR2 est la forme retrouvée au niveau cardiaque où elle est impliquée dans le couplage excitation-contraction des

cardiomyocytes mais également dans l'automatisme. Ce second aspect est discuté dans le modèle du « Ca^{2+} clock » de la partie II.3 de l'introduction.

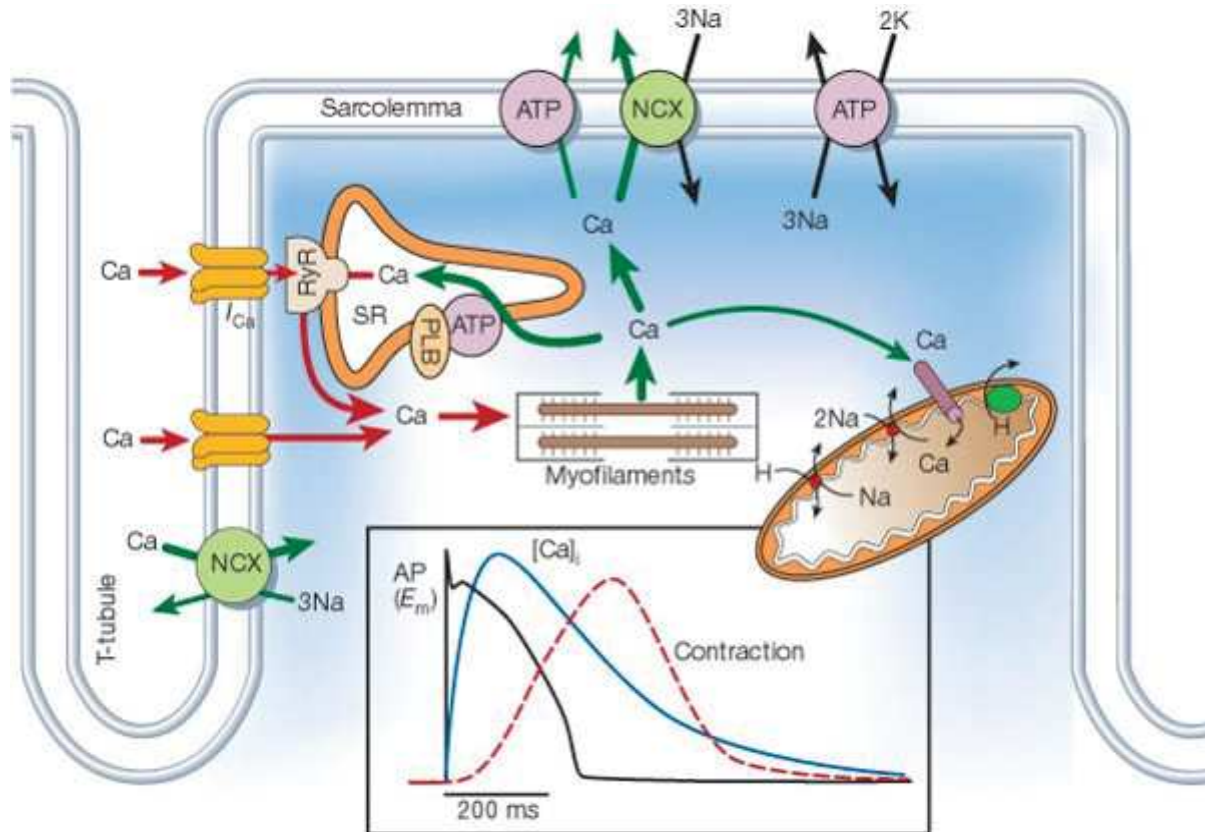


Figure 5 : Schéma du phénomène « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release » dans une cellule musculaire. Le RS est au plus proche de canaux calciques de type L à l'intérieur des tubules T pour un effet plus efficace de l'entrée de Ca^{2+} sur le récepteur à la Ryanodine. La grande quantité de Ca^{2+} libérée par le RS est utilisée pour le couplage actine-myosine. Puis il est recyclé pour recharger le RS via la pompe SERCA, intégré dans le cycle de Krebs de la mitochondrie ou extrudé de la cellule en échange d'autres cations. Image issue du département de physiologie de l'université de Mahidol.

I.2 Centres rythmogènes de l'automatisme cardiaque

I.2.1 Organisation du tissu *pacemaker*

L'ensemble du tissu cardionecteur (Figure 1A) est spécialisé dans la génération et la conduction de potentiel d'action (PA) *pacemaker*. Le NSA est le chef d'orchestre de l'automatisme, il est situé entre la veine cave supérieure et la veine cave inférieure, à la jonction de la crista terminalis (CT), proche de l'artère sinusale (Opthof 1988). Les PAs qu'il génère se propagent dans les oreillettes, occasionnant la systole auriculaire pour l'éjection du sang des oreillettes aux ventricules.

Le NAV peut également générer spontanément des PAs et sa composition est similaire au NSA. Toutefois, il ne guide pas le rythme cardiaque puisque le rythme intrinsèque de génération de PA du NSA est plus rapide que celui du NAV. Ce second nœud, plus petit, est situé plus bas dans l'oreillette, précisément dans la région postéro-inférieure du septum interatrial proche du sinus coronarien. Il transite entre l'oreillette droite et le ventricule droit et signifie un passage obligatoire dans le système de conduction du PA vers les ventricules.

Le NAV est le point d'ancrage du faisceau de His spécialisé dans la conduction. Ce faisceau se divise en deux branches qui descendent le long des parois du septum interventriculaire. Pour une contraction synchrone et complète du myocarde, le faisceau de His se ramifie pour former les FP qui se répandent dans toutes les parois des ventricules. Ces fibres à conduction rapide transmettent le signal d'excitation presque instantanément dans la totalité des ventricules pour une systole ventriculaire synchrone *via* le couplage excitation-contraction.

I.2.2 Structure, organisation et particularités du NSA

Structure du NSA

Le NSA est une structure fine composée d'une population hétérogène de cellules mélangées à une quantité importante de collagène et de fibroblastes. La finesse du tissu offre une configuration profilée pour la propagation du signal en 2 dimensions. Son centre est essentiellement composé de petites cellules *pacemaker*, dites aussi « nodales » (cNSAs), qui génèrent spontanément des PAs.

Elles s'assemblent en un maillage déstructuré (Figure 7 B) et apparaissent sous trois formes : fuseau, araignée, et allongé (Figure 4) (Verheijck, Wessels et al. 1998). Leur disposition n'est pas organisée comme peuvent l'être les myofibrilles (chaîne linéaire de sarcomères qui sont les unités contractiles du muscle). La structure du NSA change et s'organise progressivement en s'éloignant de son centre avec une quantité de myofilaments plus importante et mieux organisés. Des projections du NSA s'étendent jusque dans la CT vers l'épicarde terminal, les muscles pectinés de l'oreillette droite et le septum interatrial (Stephenson, Atkinson et al. 2017) (Figure 6).

La zone périphérique appelée « paranodale » (Chandler, Greener et al. 2009) est un intermédiaire entre le tissu sinusal et auriculaire, l'orientation des cellules permet de la distinguer. Elle est structurellement mieux organisée pour propager le signal électrique vers le muscle auriculaire. La CT est faite de manière à favoriser la conduction du PA du NSA vers le NAV grâce à une forte concentration en connexine (Cx). La Cx43 est la connexine majoritaire des jonctions « gap » qui permet le couplage électrique entre cellules.

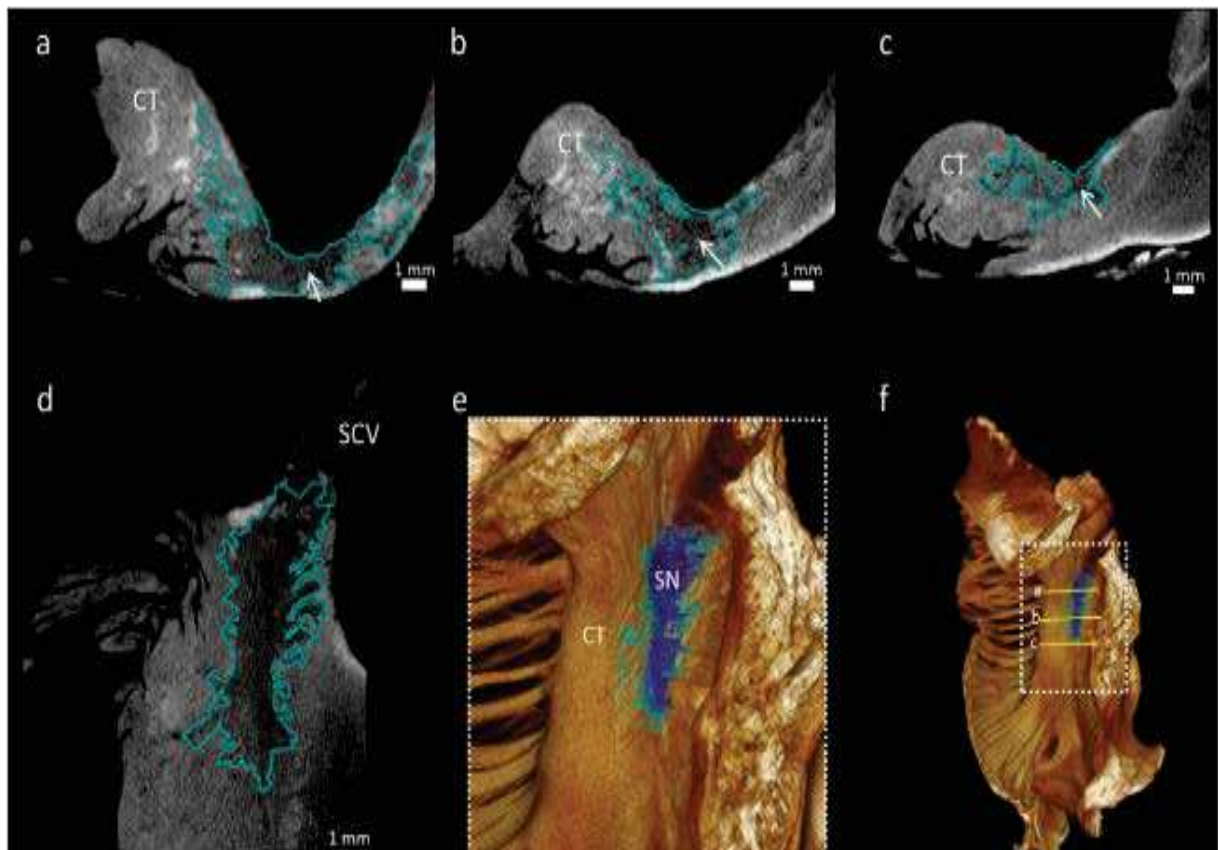


Figure 6: Structure du NSA chez l'humain en micro-CT. a, b, c : Coupes transversales du NSA humain entouré de turquoise situé proche de la Crista terminalis (CT). d : Image du sinus dans l'axe longitudinale sous la veine cave supérieure (SCV). e : Sinus (SN) en entier. f : Zones de découpe transversale vues en micro tomographie informatisé. D'après Stephenson et al., 2017

Différenciation du NSA central et de la zone paranodale

L'expression des connexines Cx43, Cx40, Cx45 ou Cx46 varie dans le NSA central et la zone paranodale. Elles ont fait l'objet de plusieurs études dans les années 90, présentées dans ce chapitre, qui ont apporté des résultats divergents. Cette divergence serait due à une variabilité de leurs expressions selon les espèces et à la complexité de l'hétérogénéité du NSA, mais également à des techniques d'immunohistochimie limitées. En effet, la reconnaissance spécifique d'un signal en immunohistochimie est plus délicate dans les cellules du NSA car les jonctions gap y sont plus petites (~90 canaux (Masson-Pevet, Bleeker et al. 1979)) que dans les cardiomyocytes atriales ou ventriculaires (Boyett, Honjo et al. 2000).

Pour la première fois en 2005, un modèle mathématique 3D de l'anatomie du NSA montre la structure du NSA central (rouge) et paranodale (bleu) ainsi que l'orientation des cellules chez le lapin (Figure 7) (Dobrzynski, Li et al. 2005). Les cellules longent la CT et les muscles pectinés, celles de la zone paranodale sont adjacentes à la CT. Les connexines Cx43 et Cx40 exprimées dans le muscle atrial ne le sont pas dans le centre du NSA qui exprime plutôt Cx45 (Coppen, Kodama et al. 1999). Cx45 est une connexine à faible conductance, ce qui a son importance puisqu'elle protège le centre du NSA d'influences électriques extérieures qui pourrait l'hyperpolariser et créer un dysfonctionnement du rythme (Joyner and van Capelle 1986).

Chez l'homme, Chandler et collaborateurs en 2009 ont marqué de manière spécifique les neurofilaments (NF-M) exclusivement exprimés dans le système de conduction cardiaque, le peptide natriurétique (ANP) du muscle atrial et la Cx43 (non exprimés dans le NSA). Ainsi, ils ont pu observer le couplage électrique entre le NSA et le muscle atrial grâce aux marquages de Cx43, NF-M et ANP dans la mosaïque cellulaire formant la zone paranodale (Figure 8) (Chandler, Greener et al. 2009).

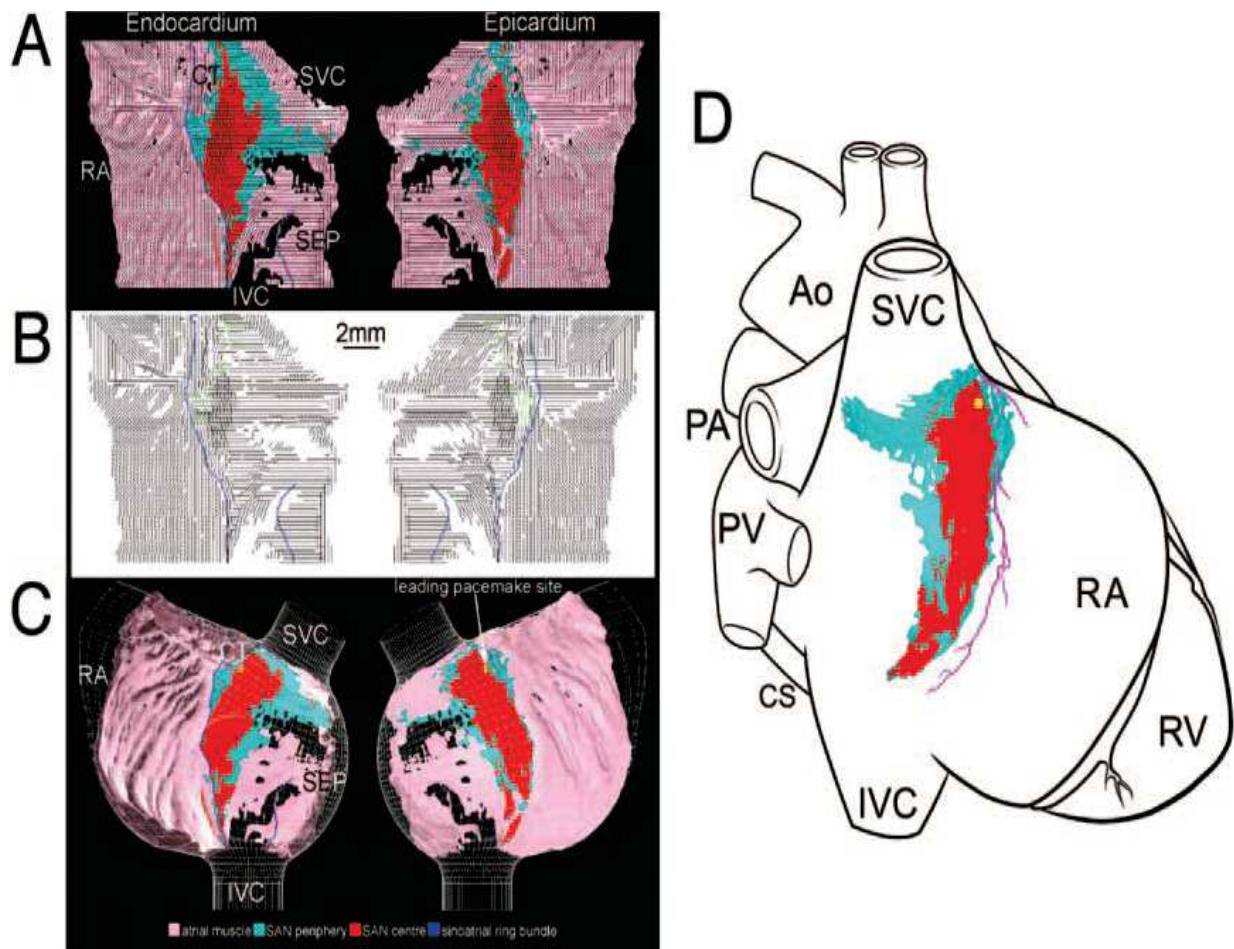


Figure 7 : Modélisation 3D du NSA chez le lapin. A : Orientation des cellules myocardiques du côté endocardique (gauche) et épicaudique (droite) B : Les lignes noires montrent l'orientation des cardiomyocytes. C : Modèle 3D de l'oreillette droite. D : Emplacement du NSA au niveau du cœur entier, sur l'oreillette droite (RA). Les autres structures indiquées sont l'aorte (Ao), l'artère pulmonaire (PA), la veine pulmonaire (PV), le sinus coronarien (CS) et le ventricule droit (RV). D'après Dobrzynski et al. 2005.

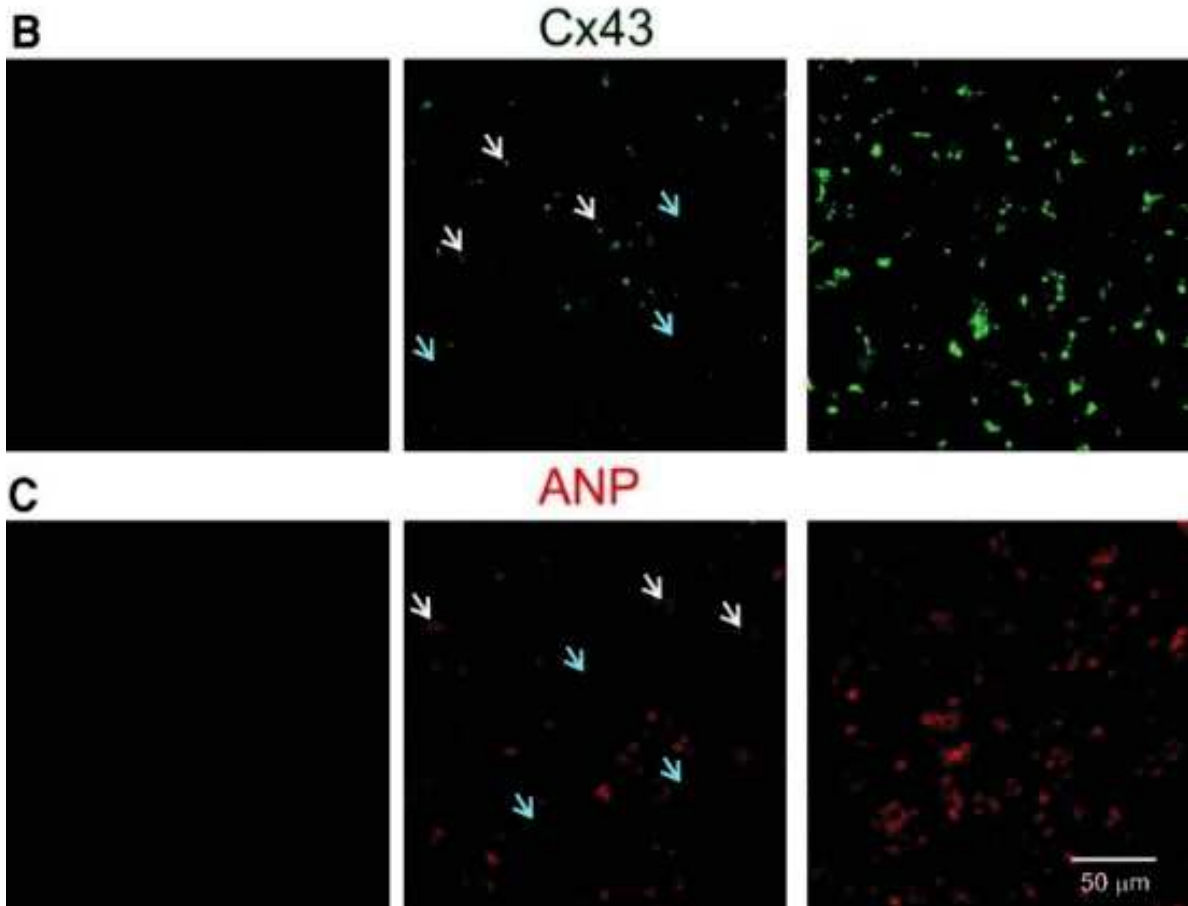
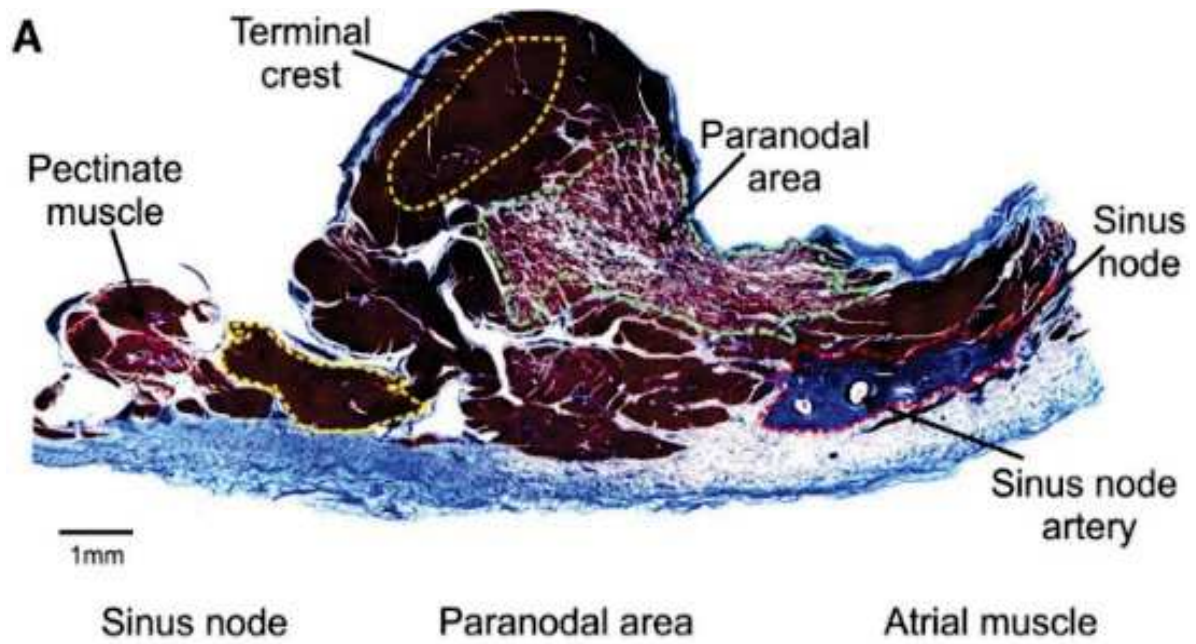


Figure 8 : Caractéristiques histologiques et immunohistochimiques du NSA chez l'humain. A : Coupe transversale du NSA et coloration de type trichromie de Masson permettant de distinguer les cellules du tissu connectif. B et C : Les immunomarquages de Cx43 et d'ANP permettent de distinguer le NSA du reste du tissu auriculaire et de mettre en évidence l'hétérogénéité de la zone paranodale. D'après Chandler et al. 2009.

Couplage histologie-électrophysiologie autour du NSA

Les études du NSA chez le petit mammifère comme le lapin, le rat ou la souris sont nombreuses et utiles car la physiologie cardiaque de ces petits rongeurs est assez proche de celle de l'humain. Notre modèle d'étude est la souris dont le cœur mesure 1 cm de longueur et la partie sinusale est environ de 2X4 mm² de surface. Cette surface minuscule qui contient l'origine de l'automatisme cardiaque, fût cartographiée par E. Verheijck et collaborateurs en 2001, dans le but d'établir une relation entre la distribution des connexines et les caractéristiques électrophysiologiques du NSA.

La cartographie de l'activité électrique réalisée avec des microélectrodes d'enregistrements a montré que le NSA a une activité électrique et un temps de conduction hétérogènes (Figure 9), (Verheijck, van Kempen et al. 2001).

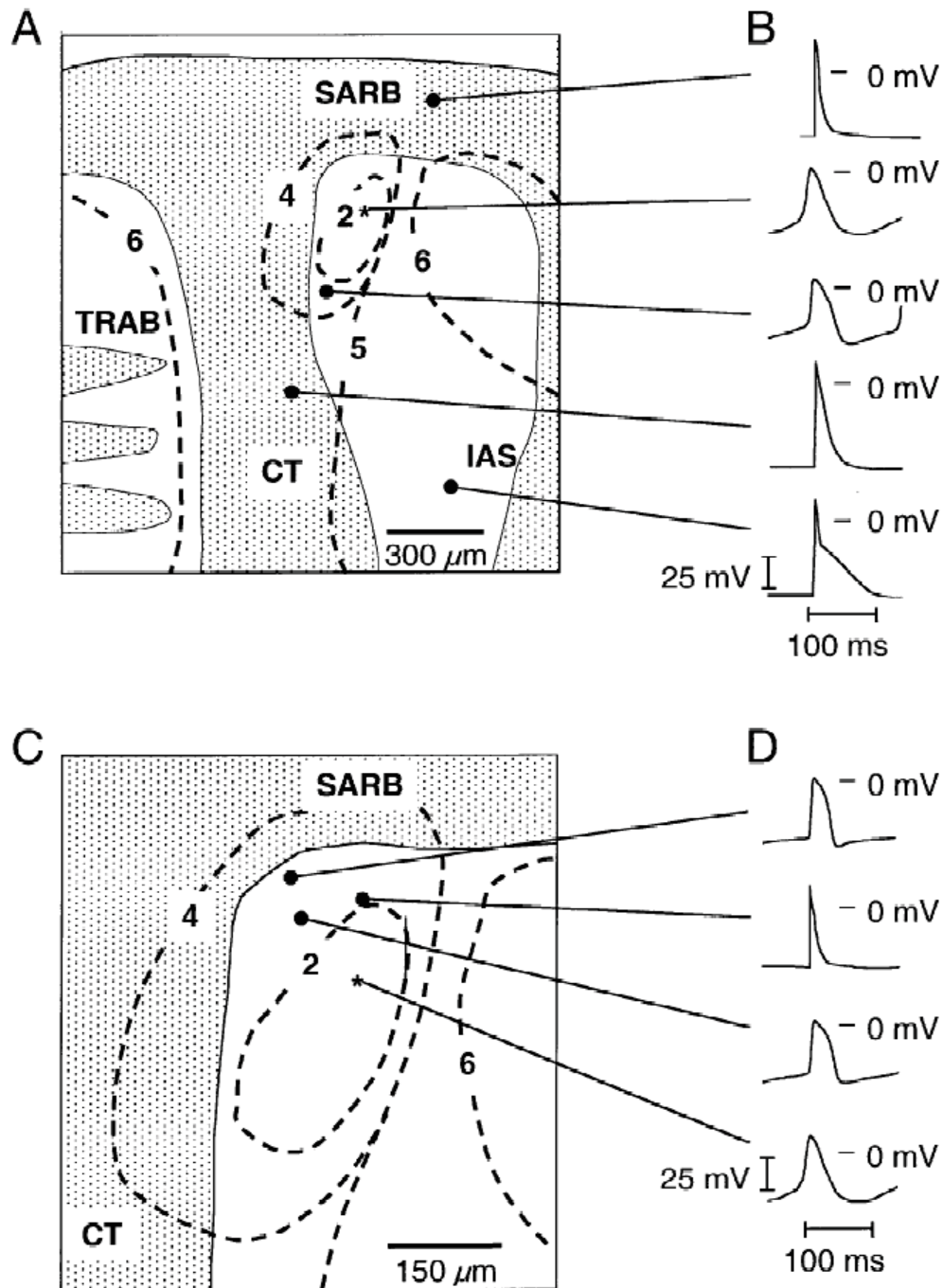


Figure 9 : Cartographie électrique du NSA. A : Au niveau du NSA central marqué d'un astérisque, les chiffres indiquent le temps d'activation de chaque zone en ms. B : Les PAs enregistrés par une microélectrode. Le NSA central sous la branche droite du cercle sinusal (SARB), montre un temps d'activation court de 2 ms et une forme caractéristique du potentiel de membrane (2^{ème} tracé en B). La partie atriale au niveau de la crista terminalis (CT) et du septum interatrial (IAS) est différenciée par la forme droite du potentiel (1^{er}, 4^{ème} et 5^{ème} tracés). La zone de transition est marquée par un temps d'activation plus long et une forme de potentiel (3^{ème} potentiel) entre celui du NSA central et le potentiel atrial. C & D : Un zoom sur la partie centrale du NSA montre la présence d'une activité électrique de type atrial très proche du NSA central (2^{ème} tracé en D) alors que des potentiels de type « nodaux » sont enregistrés dans des zones plus éloignées (1^{er} et 3^{ème} potentiels). D'après Verheijck, Van Kempen et al. 2001.

Conduction du signal

Les différents types de cartographie du NSA et l'analyse de la structure histologique sont de bons moyens pour comprendre son fonctionnement. Les chercheurs R. Efimov, VV. Fedorov & AV. Glukhov sont des spécialistes en cartographie optique du NSA. Ils identifient et caractérisent les voies de passage et les barrières de la conduction du signal du NSA vers les oreillettes. Leur modèle numérique met en évidence des informations structurelles sur le NSA et 4 voies d'échappement de la conduction (Figure 10).

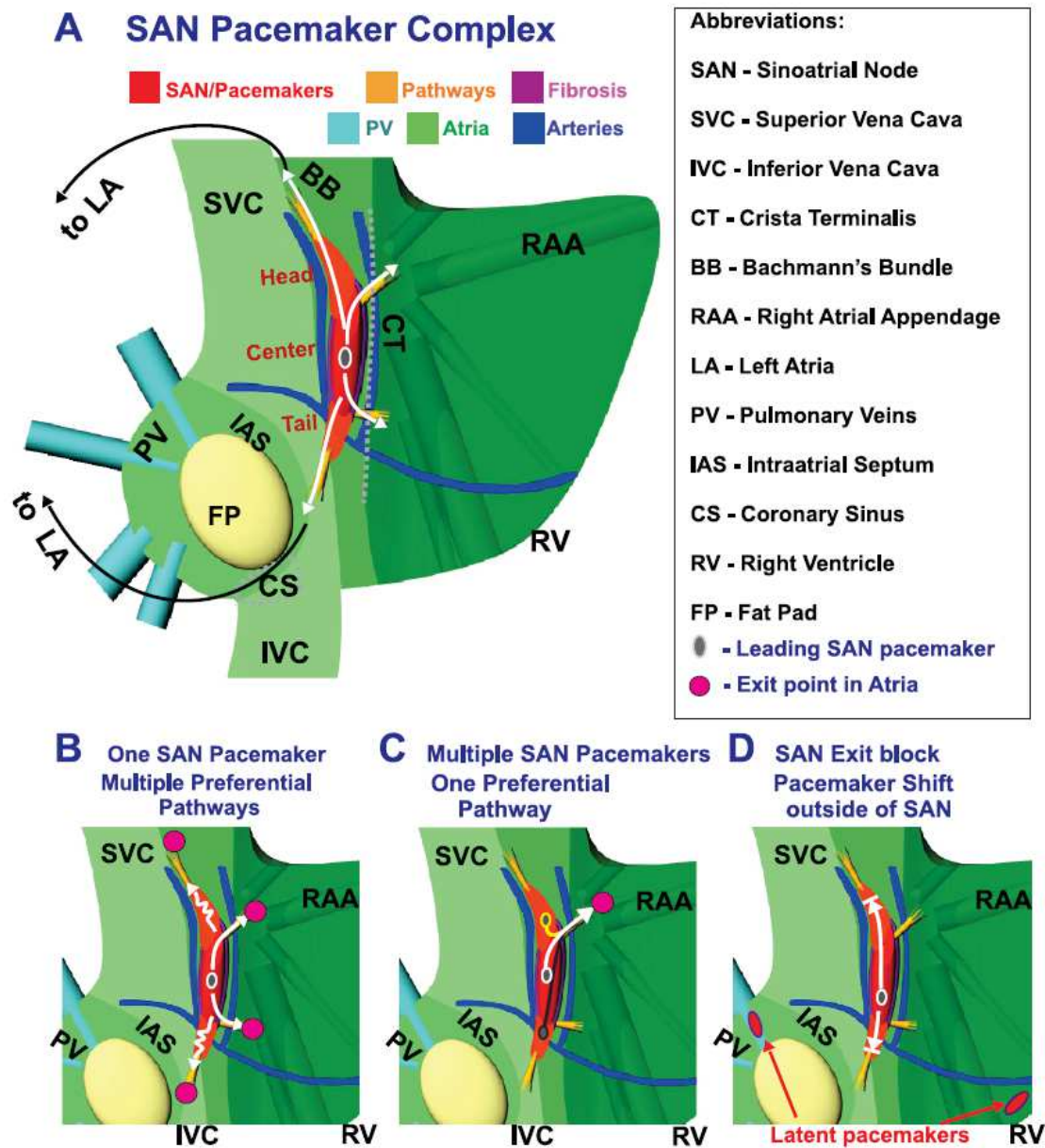


Figure 10 : Modèle numérique du NSA et voies d'échappement de la conduction à partir de données recueillies chez le chien et chez l'humain. A : Le NSA (rouge) est isolé par 3 bifurcations de l'artère coronaire (bleue) et de la fibrose (violet). Les branches jaunes représentent les voies de conduction du signal électrique. B : Des voies de conduction sont dominantes, les points roses représentent des zones de l'oreillette activées. Préférentiellement pour une contraction adéquate, les zones dans l'oreillette droite sont favorisées. C : Déplacement de l'épicentre du signal sans changement de voie de conduction. D : Echec de conduction. D'après Fedorov et al., 2012.

I.2.3 Le NAV, le second centre rythmogène

Le NAV est le second centre rythmogène dans l'oreillette droite. Il se situe à la jonction atrioventriculaire et constitue un point essentiel dans la conduction du signal électrique du NSA vers les ventricules. L'activité du NAV est dépendante du NSA. Ils sont reliés par deux voies différentes, une dite lente et une autre dite rapide (Efimov, Fahy et al. 1997, Efimov and Mazgalev 1998).

La structure et le fonctionnement du NAV a longtemps fait débat entre anatomistes et électrophysiologistes. En 2004, I. Efimov, H. Dobrzynski et collaborateurs ont relancé le débat sur la structure et la fonction du NAV en s'appuyant sur les travaux de J. Billette (Billette 2002). Sa composition est similaire au NSA central et tout comme lui, elle est hétérogène (Efimov, Nikolski et al. 2004). L'extension postérieure nodale (PNE) du NAV possède des propriétés similaires au NSA central comme l'expression de connexines à faible conductance (Cx45 à la place de Cx43), la présence de NF-M et d'HCN4 caractéristique du *pacemaker* (Figure 11).

Le NAV est une structure multifonctionnelle : en plus d'être un point essentiel dans la conduction, il a un rôle protecteur contre la tachycardie ventriculaire (qui peut induire une mort subite). En effet, en cas de tachycardie atriale, le signal à haute fréquence est bloqué par la NAV et n'est pas transmis aux ventricules. Il peut également prendre le relai dans la génération de l'automatisme en cas de dysfonctionnement du NSA.

Le reste du tissu cardionecteur associé compose le système de conduction ventriculaire. Le faisceau de His suivi des fibres de Purkinje (FP) forment un réseau spécialisé pour la propagation du signal. La grande vitesse de la propagation ($\sim 2 - 3$ m/s) est garantie par la forte expression de connexines Cx40 et de canaux sodiques au niveau des disques intercalaires. De plus, la résistance intercellulaire est très faible ($\sim 100 \Omega/\text{cm}$) (Coraboeuf, Deroubaix et al. 1979, Kleber and Rudy 2004, Haufe, Cordeiro et al. 2005). Ce réseau peut également générer un automatisme à basse fréquence (entre 25 et 40 bpm selon l'espèce) en cas de blocage du signal au NAV. Les cellules qui composent les FP ont une morphologie particulière, intermédiaire entre la cellule *pacemaker* de type sinusal et celle de type ventriculaire. Leurs propriétés électrophysiologiques sont distinctes des cellules du NSA et du NAV, leur potentiel

de membrane diastolique maximal est autour de -90 mV et leur repolarisation est lente avec un plateau.

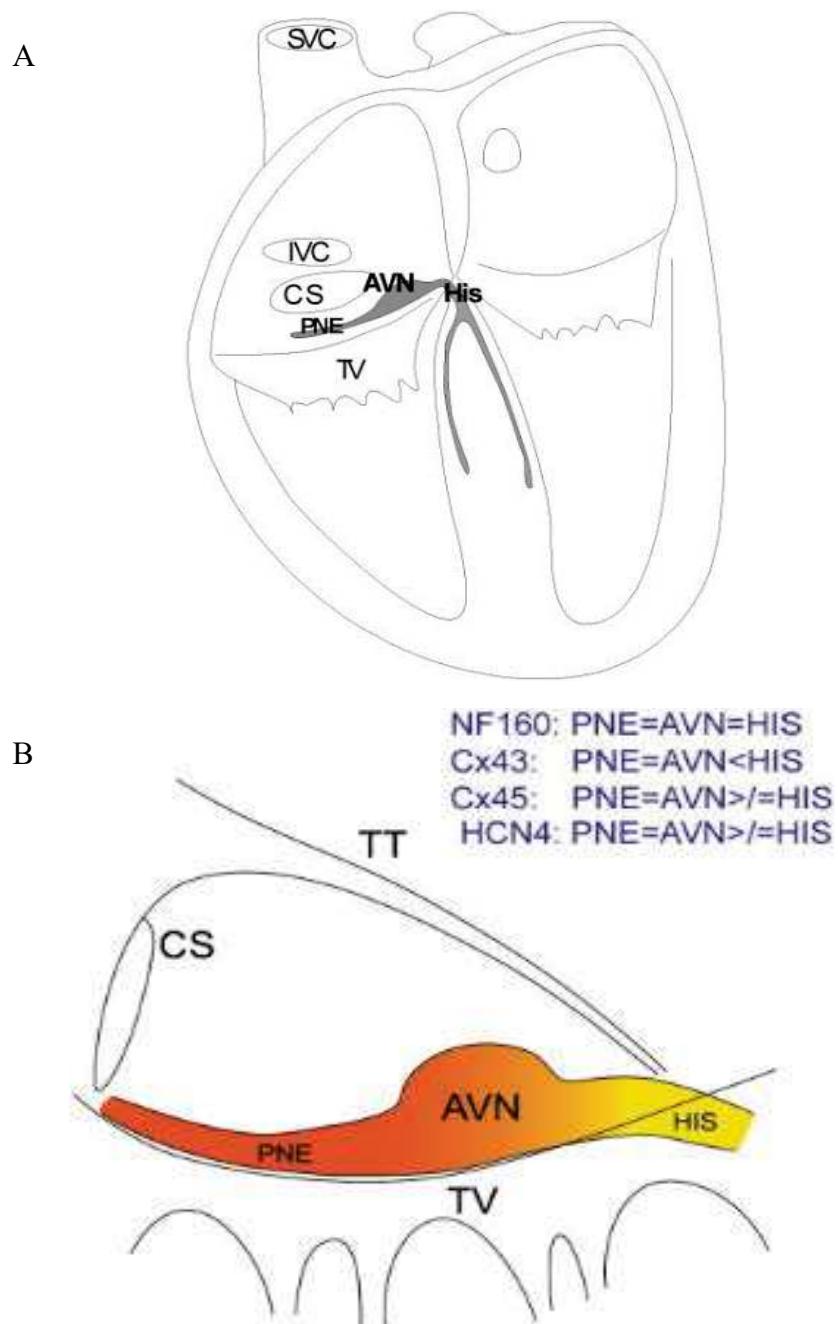


Figure 11 : Localisation du NAV. A : Localisation anatomique du nœud atrioventriculaire (AVN) et des faisceaux des His déterminé par l'expression de NF-M. Le NAV fait partie intégrante du triangle de Koch, se projetant sous le sinus coronarien (CS) par l'extension postérieure nodal (PNE), il est constitué d'un centre nodal compact au-dessus de la valve tricuspide (TV) à l'apex du triangle. B : Gradient colorimétrique de l'expression des isoformes de connexines et d'HCN4 à la jonction du NAV et du faisceau de His chez le lapin. Efimov et al, 2004.

I.2.4 Dysfonction à l'origine du *Sick sinus syndrome*

Le « *sick sinus syndrome* » (SSS) est un dysfonctionnement du NSA dans la génération du rythme et de la conduction du signal à travers le cœur. Il est associé à divers dysfonctionnements tels que la bradycardie sinusale, des pauses sinusales, des fibrillations atriales chroniques et le « syndrome bradycardie-tachycardie » alternant des phases de bradyarythmies et tachyarythmies atriales, entraînant fatigue, étourdissements et syncopes. Ces dysfonctionnements peuvent aller jusqu'à l'arrêt cardiaque (Anderson and Benson 2010).

Des formes de SSS peuvent être associées à d'autres anomalies cardiaques telles que le syndrome de Brugada et des arythmies ventriculaires (Arbelo and Brugada 2014). Le SSS est conceptualisé comme le spectre des désordres de nombreux mécanismes physiopathologiques qui convergent vers un phénotype malade identique (Figure 12: Les différentes causes des SSS. Monfredi et al. 2010).

Le SSS est le plus fréquemment d'origine acquise, notamment lié à l'âge, et les facteurs étiologiques sont nombreux. L'âge modifie l'expression de certains gènes comme Cx43, Kv1.5, Nav1.5, RyR2, HCN1, HCN2 et Cav1.2 par une sous-régulation des ARN messagers (ARNm) correspondants. La dégénérescence du NSA peut résulter d'une fibrose naturelle liée à l'âge ou à la suite d'un remodelage cellulaire après une insuffisance cardiaque ou une tachyarythmie atriale. Certains cancers métastatiques et des pathologies vasculaires peuvent être responsables d'infiltration de molécules tels que le collagène dans le NSA et provoquer un dysfonctionnement. L'atteinte du NSA peut également être anthropologique suite à des chirurgies thoraciques et cardiaques comme le remplacement d'une valve par exemple. Des infections bactériennes de type endocardite ou encore la maladie de Chagas peuvent également induire des SSS en causant principalement des problèmes de conduction atrioventriculaire. Etant placé sur la paroi atriale et alimenté par les artères coronaires atriales, le NSA est sensiblement exposé à des ischémies faisant suite au problème majeur de l'athérosclérose.

Dans d'autres cas, le SSS peut être d'origine congénitale, lié à des canalopathies qui touchent les canaux impliqués dans le *pacemaker* comme Cav1.3, Cav3.1 ou HCN4. Egalement, des

mutations sur des gènes codants pour des protéines régulatrices comme la calséquestrine (gène CASQ2) génèrent un CPVT (« *Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia* ») associé à une dysfonction sinusale.

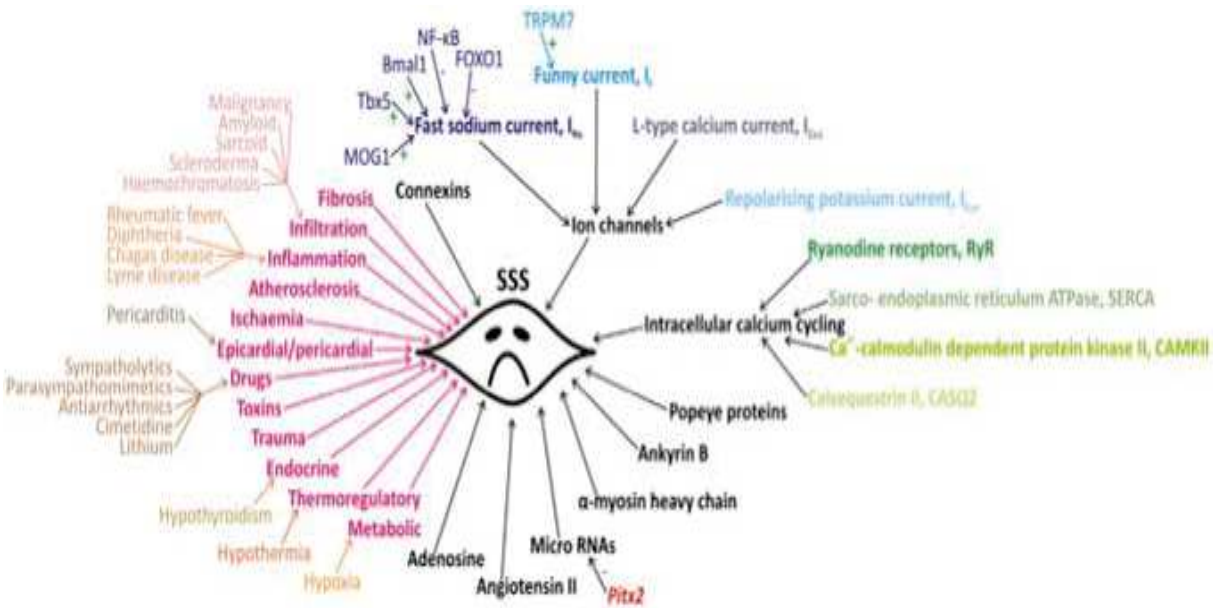


Figure 12 : Les différentes causes des SSS. Monfredi et al. 2010

I.3 Lecture d'électrocardiogramme (ECG)

Les centres rythmogènes génèrent une activité électrique qui est conduite dans le cœur pour la contraction synchrone de l'ensemble des myocytes contractiles. C'est la dépolarisation/repolarisation synchronisée de ces ensembles musculaires, oreillettes et ventricules, qui correspondent aux ondes visibles sur un ECG.

I.3.1 Ondes et activité cardiaque

L'ECG est l'enregistrement de l'activité électrique cardiaque effectué *in vivo* ou *ex vivo* à travers deux électrodes d'enregistrement placées de chaque côté du cœur suivant un axe donné² (Figure 13 B). Le type d'électrocardiogramme tel qu'on le connaît de nos jours a valu à W. Einthoven le prix Nobel de physiologie et médecine en 1924. L'ECG est désormais indispensable au diagnostic et à la surveillance de pathologies cardiovasculaires chez l'humain, il est également utilisé sur l'animal en laboratoire.

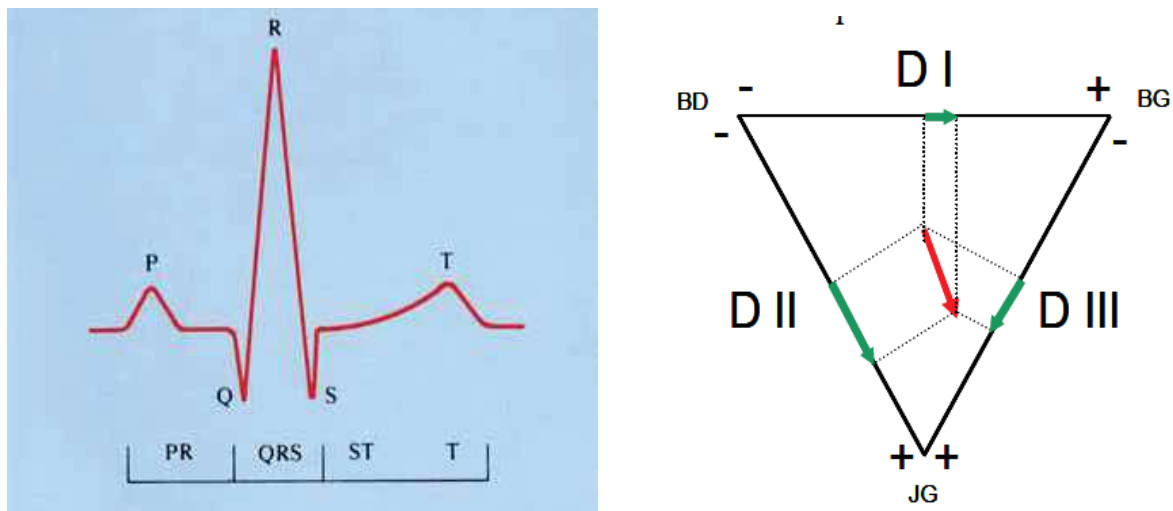


Figure 13 : ECG type et triangle d'Einthoven. A : Ondes PQRST de l'ECG. B : Triangle d'Einthoven dans lequel est placé le cœur.

² L'axe le plus classique est appelé deuxième dérivation ou bien « DII » du triangle d'Einthoven.

Chez l'homme, les différentes phases de l'ECG sont des ondes caractérisées par une lettre de l'alphabet (Figure 13 A). L'amplitude et la largeur de chaque onde expriment l'intensité et le temps de contraction du muscle cardiaque. Les intervalles entre chaque onde sont des temps de conduction du signal entre les différents compartiments cardiaques, de la génération du signal du NSA jusqu'à la repolarisation du myocarde.

L'onde P : dépolarisation auriculaire

L'onde P correspond à la contraction des oreillettes. Elle dure normalement entre 0,08 et 0,15 seconde chez l'homme.

L'intervalle P-R : la conduction auriculo-ventriculaire

Lorsque toutes les cellules des oreillettes se sont dépolarisées et que le signal de l'ECG revient à sa ligne de base isoélectrique, c'est l'instant où l'onde de dépolarisation se propage à travers le NAV pour atteindre le tissu hyper-conducteur des ventricules. Le faisceau de His et les FP assurent la conduction avec efficacité puisque cet intervalle ne dure pas plus de 0,2 seconde chez l'homme. L'intervalle P-R est un index de conduction entre les oreillettes et les ventricules dont l'allongement peut prédire des phénomènes de fibrillation auriculaire (Chun, Hwang et al. 2016).

Le complexe QRS : la dépolarisation ventriculaire

Cette phase est appelée complexe QRS en raison des nombreuses ondes qui le compose. L'amplitude du QRS est plus grande que celle de l'onde P car la masse ventriculaire est plus importante que celle de l'oreillette. En revanche, sa durée est courte, moins de 0,1 seconde chez l'homme, grâce à la propagation rapide à travers le faisceau de His et les FP ainsi qu'à l'organisation du myocarde en syncytium.

Sur l'ECG, un changement des paramètres de vitesse et d'amplitude du complexe traduit généralement un problème de conduction au niveau du faisceau de His, de type bloc de branche droit ou gauche.

Le segment ST : plateau du PA

Cette phase isoélectrique appelée intervalle ST intervient lorsque l'ensemble des cellules ventriculaires est dépolarisé. Elle reflète la durée du plateau du PA ventriculaire. Généralement, l'intervalle QT est préféré pour évaluer la durée du PA car c'est au niveau de l'onde Q que débute la dépolarisation ventriculaire.

L'onde T : la repolarisation ventriculaire

L'onde T de l'ECG correspond à la repolarisation des ventricules. Cette déflexion est longue car la repolarisation des ventricules est lente. Une onde T qui dure trop longtemps est symptomatique d'un défaut de synchronisation dans la repolarisation. Une forme anormale de l'onde T, ou une déviation de l'axe isoélectrique traduit un désordre physiopathologique mis en relation avec des ischémies d'origine endo- ou épicaudique par les cliniciens. La dispersion anormale de l'onde T ($T_{\text{peak}} - T_{\text{end}}/\text{QT}$ ratio) est corrélée au risque d'infarctus du myocarde (Tse, Wong et al. 2017).

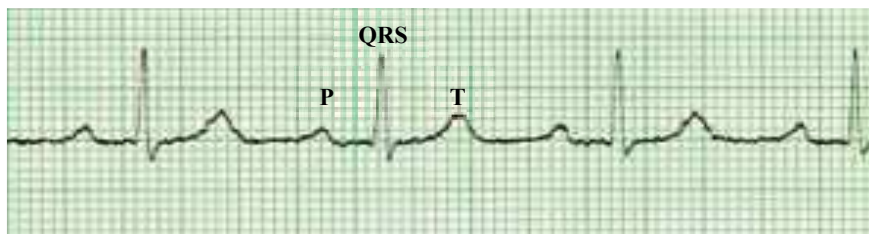
L'onde U

Sur certains tracés d'ECG, une déflexion apparaît après l'onde T, c'est l'onde U. Elle représente la repolarisation du tissu du His-Purkinje. Sa présence peut aussi traduire des problèmes physiopathologiques comme une hypokaliémie ou une ischémie myocardique.

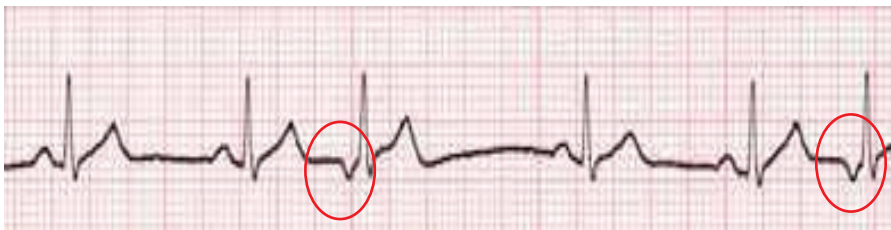
I.3.2 Dysfonctions du rythme cardiaque et ECG chez l'homme

La lecture d'ECG est une tâche délicate tant les cas de figure sont nombreux et variables. Ci-dessous sont présentés des exemples d'ECG enregistrés chez l'humain pour illustrer certains symptômes. Ces types d'anomalie sont également trouvables et interprétables chez d'autres mammifères tels que notre modèle d'étude murin. (Images de Yannick Gottwalles, Pédagogie de l'ECG, 2015)

- ECG normal : sur les ECG, les paramètres des ondes et des intervalles observés sont la durée, l'amplitude, leur rythme et leur forme. Ici le rythme est régulier, les ondes sont identiques et leur enchainement est normal.



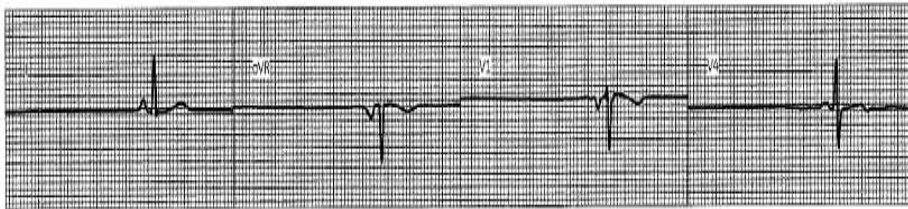
- ECG anormaux :
 1. L'onde P est anormale : les ondes P ont une morphologie différente et le rythme est irrégulier. Les ondes entourées en rouge sont inversées, elles signifient que la systole auriculaire naît dans la partie basse de l'oreillette et remonte à contre-courant vers le NSA. Sur le deuxième ECG, l'onde P négative est observée dans une dérivation inférieure qui est le signe d'une naissance proche du sinus coronarien.



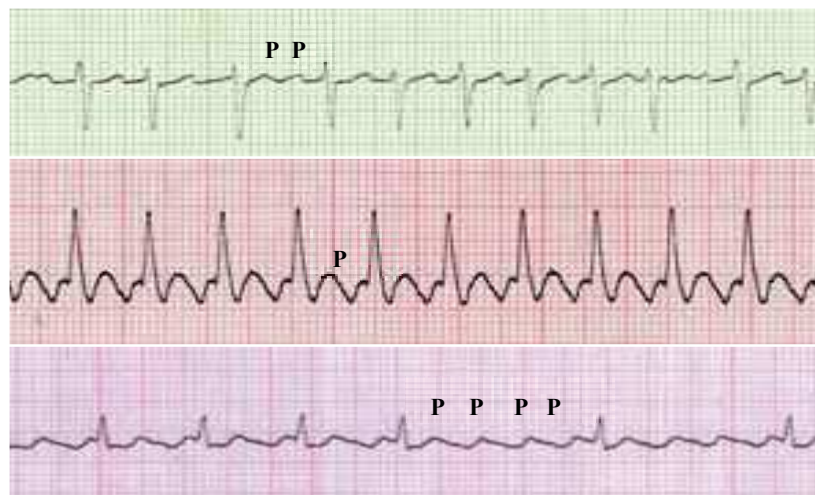
2. L'extrasystole ventriculaire : les complexes surlignés (4, 5 et 6^{ème}) montrent des ondes aberrantes élargies avec un axe opposé aux complexes QRS observés (1, 2, 3^{ème}). Leur origine est ventriculaire et non sinusale car ils ne sont pas précédés d'une onde P.



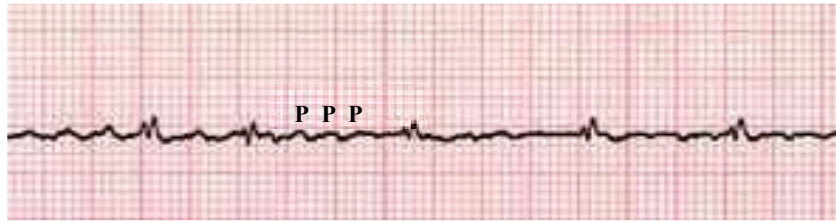
3. La bradycardie : le rythme cardiaque est ralenti.



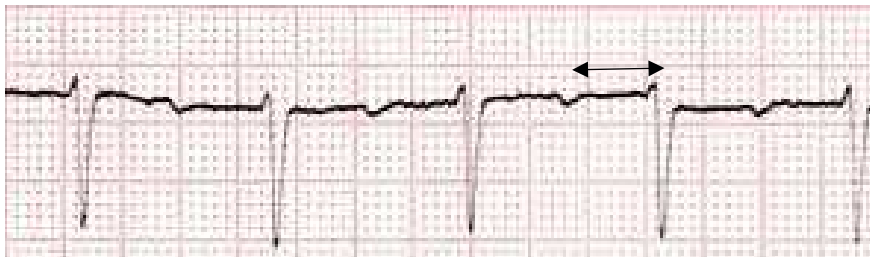
4. La tachycardie : la fréquence cardiaque augmente. En cas de nombre inégal d'onde P et de QRS ($P > QRS$), c'est une tachycardie auriculaire conjuguée à des blocs de conduction entre oreillettes et ventricules (ECG 1 en vert). En fonction de l'aspect de P et de QRS (dents de scie, toit d'usine), la tachycardie peut être caractérisée de « Flutter » (rose & violet).



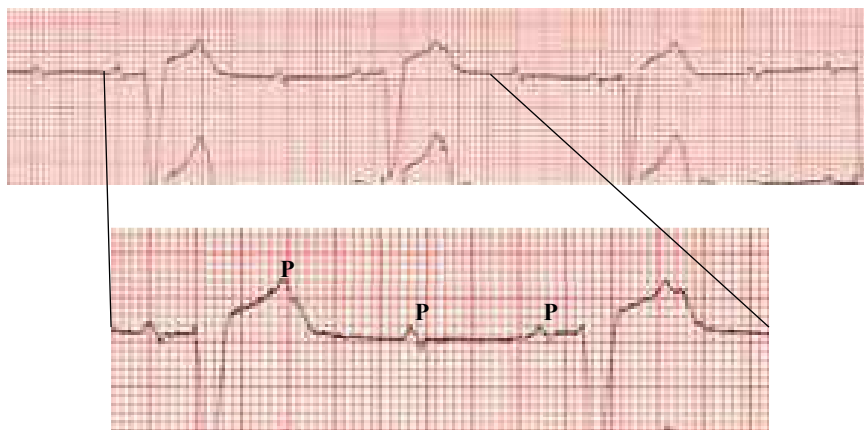
5. La fibrillation auriculaire (FA) : c'est un emballement du rythme auriculaire, le signal électrique est arythmique et n'est pas conduit aux ventricules.



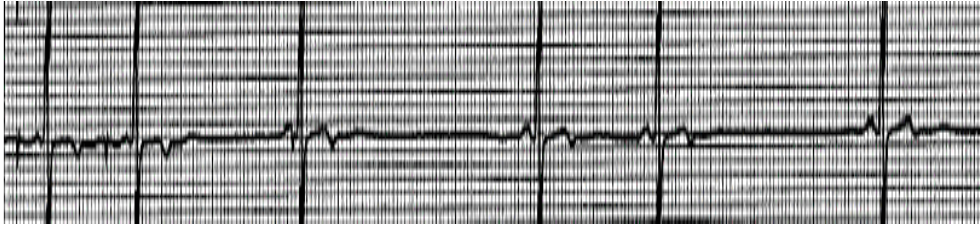
6. Les blocs auriculo-ventriculaires (AVBs) ou Mobitz : les AVBs sont par définition des défauts de la conduction entre les oreillettes et les ventricules. Leur gravité est définie par trois degrés. L'AVB du premier degré est un allongement de l'intervalle PR (double flèche), la conduction atrioventriculaire s'effectue mais plus lentement.



Lorsque la conduction du signal ne passe pas aux ventricules, on peut observer des ondes P isolées, non suivies d'un complexe QRS. Dès lors, ce sont des AVBs de second degré. Les AVBs de troisième degré sont identifiables quand le rythme intrinsèque de l'oreillette (P) et celui des ventricules (QRS) sont totalement dissociés.



7. La pause du NSA : il y a un allongement de l'intervalle PP qui traduit une pause de l'activité du NSA.



Partie II : Mécanisme fondamental de l'automatisme cardiaque

La mécanistique fondamentale permettant au nœud sinusal de générer l'automatisme cardiaque fait l'objet d'importantes recherches en lien avec les maladies cardiovasculaires. Dans cette seconde partie de l'introduction nous entrons dans le domaine spécifique de l'électrophysiologie cardiaque qui définit tous les phénomènes électriques qui émanent du coeur. Dans un premier temps, j'exposerai une brève initiation à l'électrophysiologie cardiaque avec une description de la singularité du PA d'origine sinusale. Puis nous traverserons le temps et les grandes découvertes dans cette thématique avec A. Keith, D. Noble, D. DiFrancesco et alius, avant de terminer par l'état des lieux actuel des connaissances sur le mécanisme fondamental du pacemaker. Ceci dans le but de mieux placer cette étude dans son contexte, car malgré un stade avancé de nos connaissances, il existe des incertitudes et des controverses sur la génération et la régulation de l'automatisme cardiaque.

Je m'appuierai sur plusieurs revues majeures de M.E. Mangoni, M. Boyett et O. Monfredi (Boyett, Honjo et al. 2000) (Mangoni and Nargeot 2008), (Monfredi, Dobrzynski et al. 2010) qui décrivent l'automatisme d'un point de vue électrophysiologique chez différents modèles animaux.

Ensuite, notre étude sur les souris KO au laboratoire nous permettra de répondre à certaines interrogations sur le sujet.

II.1 Génération de l'automatisme par le nœud sinusal

II.1.1 Bases d'électrophysiologie cellulaire

A la base de l'automatisme cardiaque il y a la génération spontanée de PA au niveau des centres rythmogènes du cœur. Par convention, les cellules sont polarisées, le gradient de charge est positif à l'extérieur et négatif à l'intérieur. Les PAs sont générés grâce à la variation du potentiel de membrane des cellules. Ces variations sont dues à des flux d'ions à travers la membrane par des protéines transmembranaires appelées canaux ioniques.

Ces flux d'ions sont appelés courants et notés I . I est dépolarisant quand le flux de cations (chargé +) est entrant ou d'anions (chargé -) est sortant. Inversement, I est repolarisant par un flux d'anions entrant ou de cations sortant (Figure 14). Le déplacement des ions à travers un canal, entre deux compartiments, est soumis à deux forces : le gradient de concentration de l'ion (du compartiment le plus concentré vers le moins concentré) et le gradient électrique (l'ion chargé a tendance à être attiré par la charge opposée à la sienne). Ces deux forces peuvent être de même signe ou bien opposés, il existe donc un potentiel d'équilibre de l'ion défini par l'équation de Nernst.

L'état des canaux ioniques dépend de plusieurs phénomènes et voies de signalisation, ils peuvent être sous 3 états différents : ouvert, inactivé ou fermé. A l'état ouvert, les ions traversent les canaux par leurs pores jusqu'à leur potentiel d'équilibre. Le canal se retrouve inactivé, il est alors indisponible et le passage d'ion est bloqué. Lorsque le gradient de l'ion baisse, le canal passe de l'état inactivé à un état fermé, disponible pour se rouvrir. Ainsi, l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques ont des cinétiques d'activation et d'inactivation qui dépendent de leur état. La période réfractaire est le temps pendant lequel la cellule ne peut se dépolariser à cause de l'état inactivé dans lequel se trouvent les canaux dépolarisant du PA (Na_v et Ca_v). Cette phase d'inactivité a un rôle protecteur qui permet la synchronisation électrique du tissu et empêche la génération de PA ectopique et un dysfonctionnement de l'automatisme.

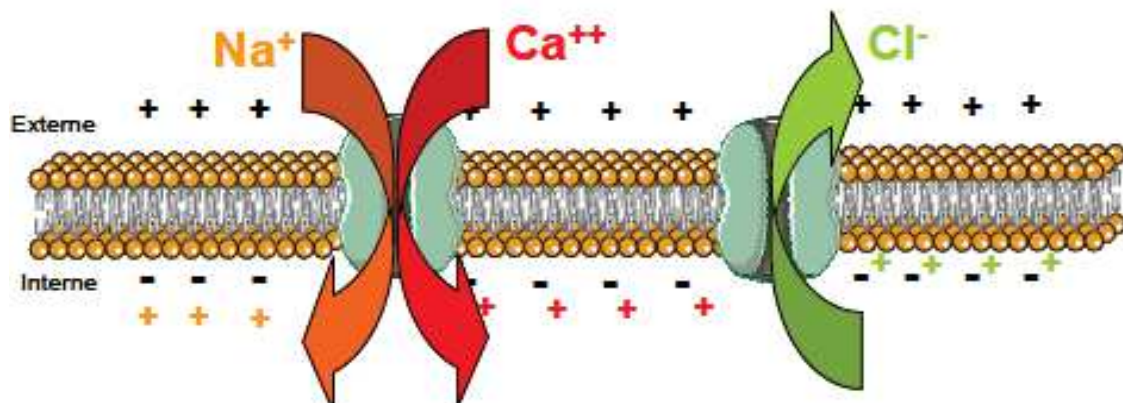
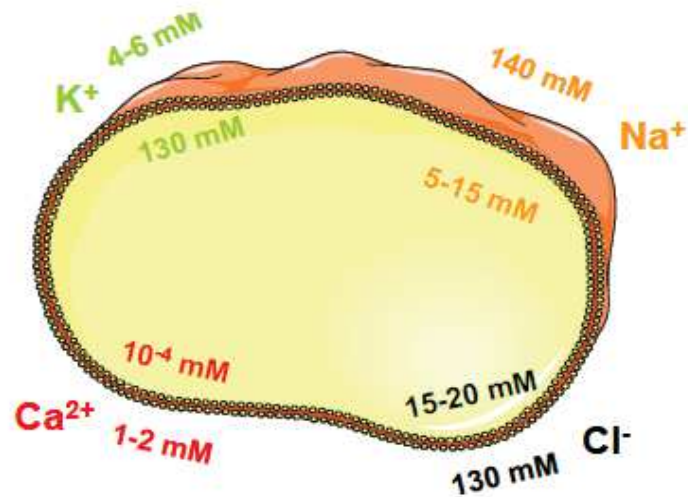


Figure 14 : Les différents ions tels que le K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ou le Cl^- suivent leur gradient de concentration entre le milieu extra et intracellulaire lors de l'ouverture de ces canaux. (Images de « Servier medical art »)

II.1.2 Caractéristiques différentielles du PA sinusal

On s'intéresse au PA d'origine sinusale (Figure 15), il est différenciable par la nature des courants qui le composent et lui donnent sa forme et ses propriétés électrophysiologiques particulières.

Le PA d'origine sinusale est composé de 4 phases :

- la phase de dépolarisation systolique de la membrane. C'est une vive entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. C'est le courant calcique voltage dépendant (sensible au potentiel) de type L ($I_{\text{Ca,L}}$) via le canal $\text{Ca}_v1.2$ qui est le seul impliqué dans cette phase.
- pendant la phase de repolarisation, les gradients de charge s'inversent, les canaux ioniques de la phase précédente se ferment et s'inactivent pendant que d'autres s'ouvrent, laissant un flux d'ion K^+ sortant. Ce sont des courants potassiques dépendants du voltage I_{Kr} (famille ERG), I_{Ks} (KCNQ1) et I_{to} (K_v1 & 4) qui repolarisent le potentiel de membrane de la cNSA en proportion variable en fonction de l'espèce. La repolarisation est aussi soutenue par le courant rectifiant I_{KACh} . La phase de repolarisation peut se prolonger en une hyperpolarisation.
- la dernière phase est généralement une phase de repos dans les cardiomyocytes classiques où le potentiel reste stable et prêt à être dépolarisé à nouveau.

Dans les cNSAs, le potentiel de membrane se dépolarise spontanément. C'est la caractéristique des cellules automatiques et du *pacemaking*. Cette phase appelée dépolarisation diastolique (DD) spontanée dépend de l'ouverture d'un ensemble de canaux spécifiques jusqu'au seuil de déclenchement d'un nouveau PA. Parmi ces canaux, HCN4 (« *Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid* »), qui est responsable du fameux courant I_f et activé par l'hyperpolarisation de la phase précédente.

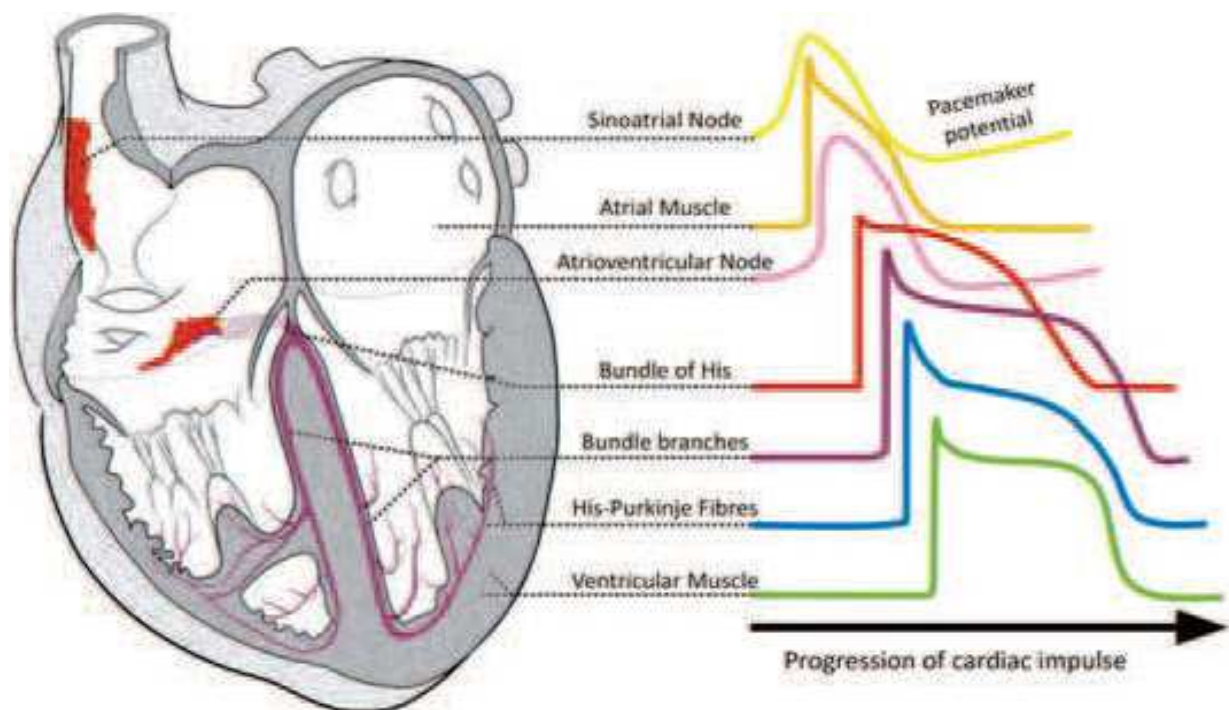


Figure 15 : Schéma du cœur et des différents potentiels d'action. Les PAs typiques (droite) des différentes régions du cœur (gauche) en suivant de haut en bas l'axe de la conduction. D'après Monfredi et al., 2010 inspiré par (Li, Greener et al. 2008) et (Dobrzynski, Boyett et al. 2007).

L'activité d' I_f permet au potentiel de membrane de se dépolariser et d'atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type T $Ca_v3.1$ puis de type L $Ca_v1.3$ ainsi que les canaux sodique $Na_v1.1$, qui vont poursuivre la DD. Pendant la phase finale de la DD, la dynamique calcique intracellulaire crée un courant sodique entrant *via* l'échangeur NCX. Cet engrenage permet d'atteindre spontanément le seuil de déclenchement d'un nouveau PA par l'activation de $Ca_v1.2$ de nouveau pour recommencer le cycle *pacemaker* (Figure 16).

La DD n'est pas la seule caractéristique du potentiel de membrane sinusal. Le seuil de déclenchement de PA est autour de -45/-35 mV pour le sinusal et -80 mV pour l'atrial, et également la phase d'ascension exponentielle du PA est dépendante de courant calcique pour le sinusal alors qu'elle est majoritairement sodique pour l'atrial. En conséquence, la vitesse du PA sinusal est inférieure à celle du PA d'une cellule musculaire atriale classique. La phase de repolarisation diffère également, sans plateau pour le potentiel de membrane sinusal.

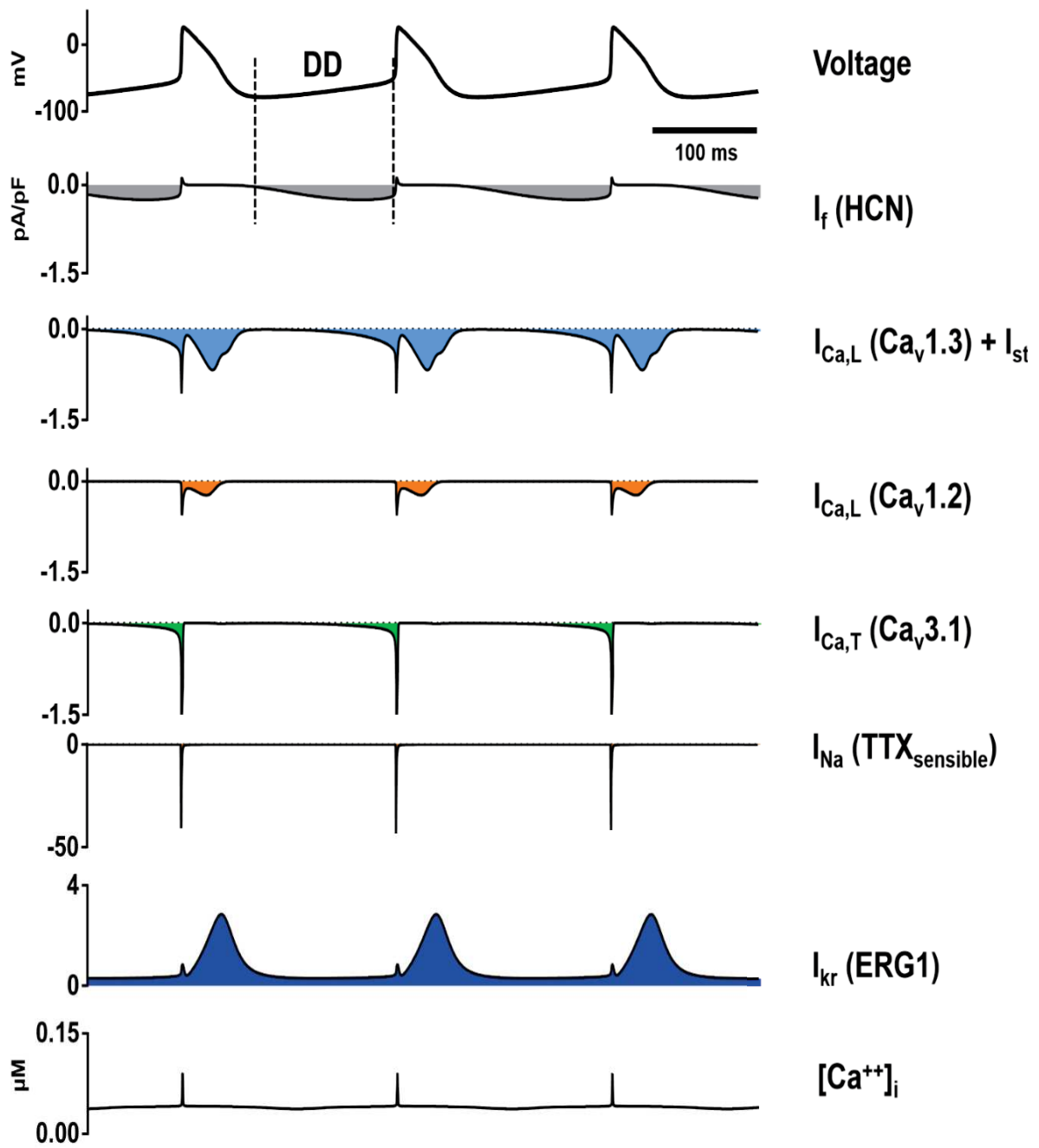


Figure 16 : Simulation numérique de l'activité spontanée d'une cellule pacemaker de souris, montrant des potentiels d'action et les courants ioniques contribuant. D'après Mesirca et al., 2018.

II.2 Histoire de l'électrophysiologie cardiaque

Le cœur a toujours suscité un grand intérêt dans différents domaines, de la science à la philosophie en passant par la religion. Son étude a traversé les siècles et les continents, ce qui en a fait un organe multi-symbolique.

II.2.1 « De naturali parte medicinae » de J. Fernel

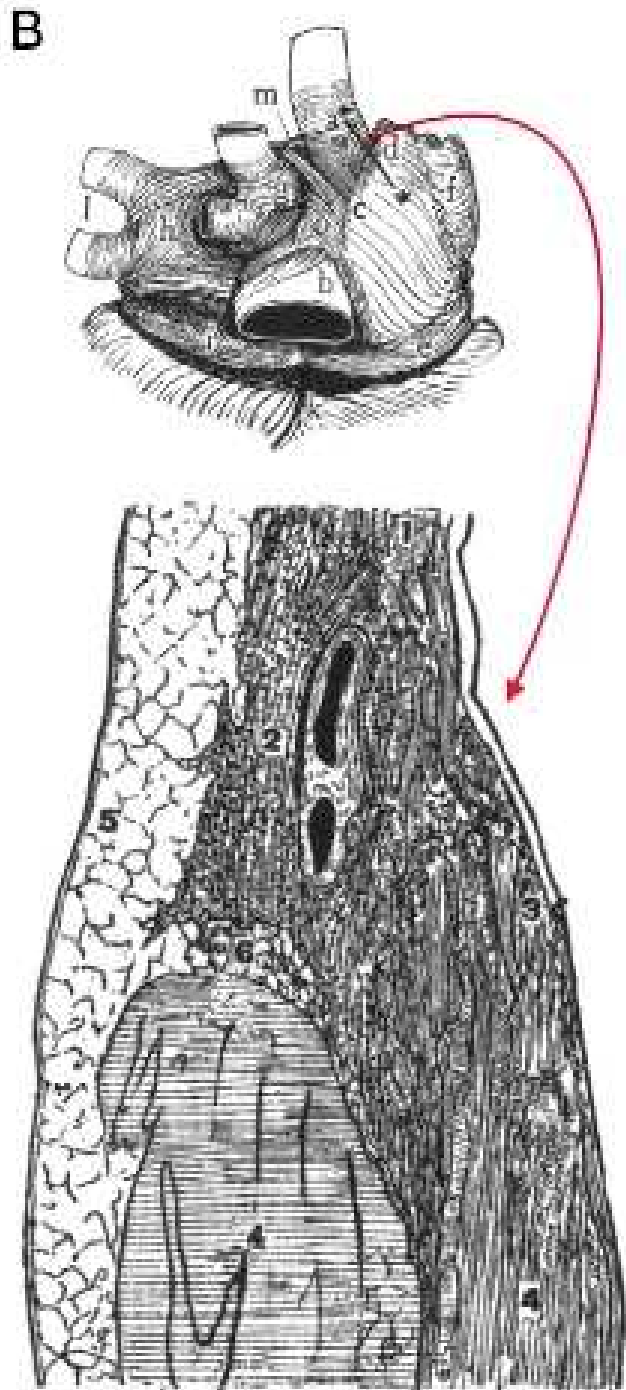
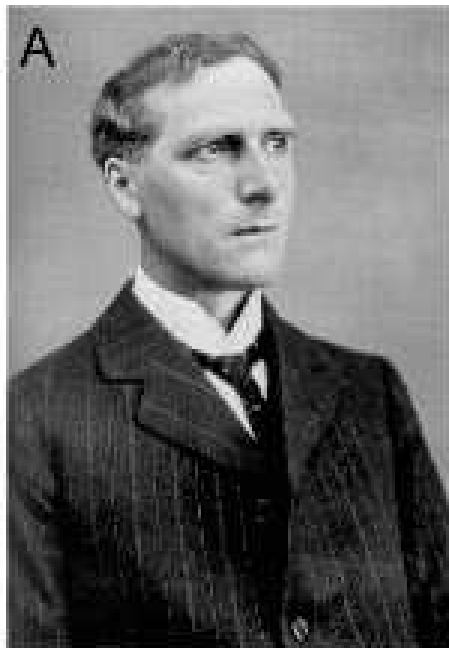
Nous débutons cette partie historique à partir du XVI^{ème} siècle et l'apparition du terme « physiologie » que Jean Fernel décrit pour la première fois en 1547 dans son traité « *De naturali parte medicinae* ». Il décrit ce terme comme étant la connaissance de la « nature de l'homme sain, de toutes ses forces et de toutes ses fonctions ». Il s'en suivra de grandes découvertes anatomiques comme la circulation pulmonaire et les valves cardiaques par A. Cesalpino en 1571, puis la circulation sanguine du cœur aux capillaires au XVII^{ème} (W. Harvey et M. Malpighi). Au XVIII^{ème}, G.M. Lancisi, J.B. Morgagni, E. Jenner puis C. Parry décriront les dysfonctionnements du système cardiovasculaire en attribuant des symptômes à des pathologies.

C'est à partir du XIX^{ème} siècle que l'on commence à comprendre et considérer l'activité électrique du cœur grâce à l'apparition des premiers électrocardiographes. W. Einthoven (1860-1927) développa un système assez élaboré permettant d'obtenir un ECG et d'identifier les différentes ondes (Figure 13), ainsi que des blocs auriculo-ventriculaires et des extrasystoles. Grâce à ces avancées technologiques, T. Lewis décrira la fibrillation puis les flutters auriculaires entre 1912 et 1920, et M.H. Robinson et A. Hermann la tachycardie ventriculaire en 1921.

En parallèle, les structures anatomiques responsables de l'automatisme sont mises en évidence par J. Purkinje (FP, 1787-1869), W. His (Faisceau de His, 1863-1934), S. Tawara (NAV, 1873-1952) et M. Flack (1882-1931) encadré par A. Keith (NSA, 1866-1955) (Figure 17). Après plusieurs siècles de découvertes sur l'anatomie et la physiologie du cœur, de nouvelles étapes sont franchies avec les avancés en électrophysiologie.

Le premier PA cardiaque sur cœur de mammifère a été enregistré en 1949 par S. Weidmann et E. Coraboeuf, considérés comme les pères de l'électrophysiologie cardiaque. Ils ont déterminé l'importance des ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ dans la mécanique et la régulation de l'activité électrique

cardiaque. Cet évènement marque le point d'ancrage de la recherche sur le mécanisme fondamental au niveau cellulaire.



- a, superior caval vein
- b, inferior caval vein
- c, terminal crest
- i, coronary sinus
- k, base of ventricles
- l, left pulmonary veins
- ** line of section below
- 1, muscle of superior caval vein
- 2, sinus node artery surrounded by sinus node tissue
- 4, terminal crest
- 5, sub-epicardial tissue
- 6, connective tissue between sinus node and terminal crest

Figure 17 : Portrait d'Arthur Keith et ses dessins représentant la partie dorsale de l'oreillette droite humaine et la coupe longitudinale du NSA. 1907

II.2.2 « The surprising heart » de Denis Noble

Dans la revue de 1984, « *The surprising heart* », D. Noble raconte l'histoire de la modélisation du PA cardiaque dont il est l'un des pionniers.

De 1960 à 1963, D. Noble et ses confrères O.F. Hutter, P. Carmeliet et A.E. Hall font les premiers pas et souhaitent définir ce qui différencie la cellule cardiaque de la cellule neuronale. Ils distinguent les courants de fuite sodique $I_{b,Na}$ et le courant potassique I_{K1} dans la cellule cardiaque et observent une réduction de la magnitude et de la vitesse du courant retardé I_{K2} (conductance G_{K2}) dans les FP en comparaison avec la fibre nerveuse (Hutter and Noble 1960, Carmeliet 1961, Hall, Hutter et al. 1963, Hall and Noble 1963). Ils définissent ces courants comme étant impliqués dans le *pacemaker* dans les FP.

En 1963 et 1966, R.K. Orkand & R. Niedergerke mettent en évidence le rôle prédominant du Ca^{2+} dans le *pacemaker* en tant que courant entrant appelé à l'époque I_{si} ³ (Niedergerke 1963, Niedergerke 1963, Niedergerke and Orkand 1966).

Puis H. Reuter et collaborateurs, en 1967, enregistrent un courant entrant en absence de Na^+ qui dépend exclusivement du Ca^{2+} extracellulaire. C'est un courant obtenu après 100ms qui met plusieurs centaines de millisecondes à s'inactiver (Reuter 1967). Cette particularité a son importance et les chercheurs s'interrogent sur les interactions du Ca^{2+} dans la contraction et le maintien du plateau calcique du PA cardiaque. Cette particularité a été observée par d'autres chercheurs comme J.S. Rougier, G. Vassort, D. Garnier, Y.M. Gargouil & E. Coraboeuf (Garnier, Rougier et al. 1969).

³ Pour « second inward » ou « slow inward current ».

En 1969, les électrophysiologistes découvrent qu'il existe une grande diversité de cinétique d' I_{si} dans les cellules cardiaques (inactivation de 20ms à 1s) (Garnier, Rougier et al. 1969). Cette diversité observée dans les FP suggère qu' I_{si} est composé de plusieurs composantes.

De 1968 à 1982, D. Noble collabore avec R. Tsien, A.E. Hall, R.E. McAllister, G. Isenberg, P. Carmeliet et D. DiFrancesco sur la compréhension de la mécanique des courants potassiques dans le *pacemaker*. Ils découvrent qu'il existe deux fenêtres de voltage pour l'activation de courants potassiques avec des propriétés de cinétique d'activation distinctes (Noble and Tsien 1969, Noble and Tsien 1969, Tsien and Noble 1969, Hauswirth, Noble et al. 1972).

- L'une, comprise entre -40 et +20 mV, correspond à la fenêtre d'activation du courant retardé I_K^4 sensible au Baryum (Ba), comme le courant I_{K1} décrit plus tôt (Carmeliet 1980, DiFrancesco 1981, DiFrancesco 1982).
- L'autre, entre -100 et -60 mV, I_{K2} , sensible au Césium (Cs^+) a été définie précédemment comme « *pacemaker* » (Isenberg 1976).

Perçu dans un premier temps comme un courant chlorure à cause de sa dépendance à cet ion, le courant transitoire noté I_{to} est également caractérisé comme « *pacemaker* ». Il est partiellement bloqué par la 4-aminopyridine (4-AP) et aboli en présence d'un chélateur de Ca^{2+} , l'EGTA. Il a ensuite été défini comme un courant K^+ dépendant de $[Ca^{2+}]_i$ et de $[K^+]_e$ (Kenyon and Gibbons 1979, Boyett 1981).

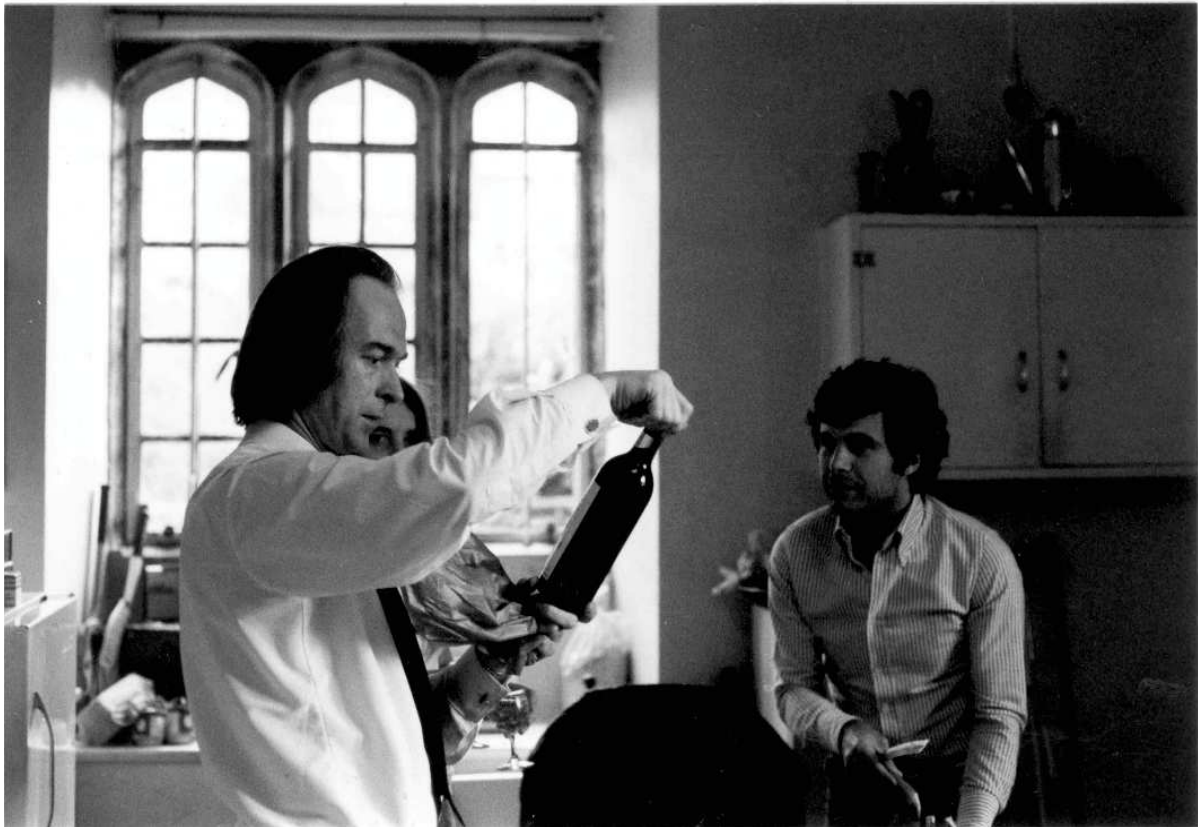
En 1962 voit le jour un premier modèle de PA cardiaque comprenant I_{Na} , I_K , I_{K1} et $I_{b,Na}$. Puis un autre nouveau avec l'addition des courants I_{si} , I_{K2} et I_{to} en 1975 (McAllister, Noble et al. 1975). Ce modèle abrégé MNT (pour McAllister, Noble & Tsien) sera utilisé pour l'étude du mécanisme *pacemaker* jusqu'à l'arrivée en 1979 de la technique du *patch clamp* qui fût une véritable révolution dans le domaine de l'électrophysiologie. De ce fait, le modèle MNT a été abandonné, au détriment du *patch clamp*, apportant des résultats plus significatifs sur des cultures primaires de cellules isolées issues des FP et du NSA.

⁴ Appelé aussi I_K ou encore g_{K2}

Grâce au *patch clamp*, R.E. McAllister & D. Noble reviennent sur leurs résultats de 1966 concernant I_{K2} dans les FP. Ils soupçonnent que ce courant soit dépendant du Ca^{2+} à cause de sa disparition lors de la suppression du Na^+ dans la solution. La disparition du Na^+ augmente la concentration du Ca^{2+} intracellulaire qui diminue I_{K2} ($[Na^+]=0 \rightarrow [Ca^{2+}] \uparrow \rightarrow I_{K2} \downarrow$).

Etrangement, le potentiel d'inversion d' I_{K2} ne correspond pas au potentiel évalué par l'équation de Nernst. Les chercheurs vont jusqu'à remettre en question plusieurs paramètres comme les concentrations en K^+ dans les différents compartiments qu'ils suggèrent être dûes à la morphologie particulière de la cellule.

Une seconde hypothèse est émise en lien avec des similitudes avec le courant I_f décrit dans les cNSAs par Dario DiFrancesco.



Photographie du Dr. Denis Noble, Dr. Dario Di Francesco et Dr. Susan Noble, 1977. Oxford. Collection personnelle.

II.2.3 « Funny current », I_f de D. DiFrancesco

Le courant I_f , dépendant du Na^+ et du K^+ , est déjà décrit comme étant un courant *pacemaker* dans le NSA (Brown, DiFrancesco et al. 1979). L'hypothèse est qu' I_{K2} ne serait pas uniquement un courant entrant de K^+ . Il y aurait au moins deux composantes, dont I_{K1} sensible à $[K^+]_e$, et d'autre part I_f .

D'après D. DiFrancesco & Noble, 1982, 1984 :

$$i_{K2}(t) = \Delta i_{K1}([K]_e) - i_f(t),$$

Ce fût l'axe de recherche de D. DiFrancesco, M. Ohba & C. Ojeda dès 1979. Ils ont étudié le potentiel d'inversion E_K d' I_{K2} et la spécificité de ce courant vis-à-vis du potassium.

Puis D. DiFrancesco & D. Noble travaillèrent sur la spécificité ionique d' I_{K2} au Na^+ et au K^+ et cherchèrent à déterminer leurs implications dans l'automatisme des cellules des FP. Ils découvrirent que le blocage d' I_K par le Barium (Ba) transforme le courant I_{K2} des FP en courant I_f (Figure 18). Ils concluent alors qu' I_{K1} masquait la nature de l'activation d' I_{K2} , activé par l'hyperpolarisation comme I_f .

Ils publieront dans les années 80 cette découverte renversante ainsi qu'un nombre important d'articles sur les propriétés et la régulation de ces courants.

Le courant I_f est désormais décrit dans toutes les cellules *pacemaker* du NSA, NAV et FP comme étant un courant entrant activé par l'hyperpolarisation de la membrane (généralisé par les canaux de la famille HCN) à un voltage de -40/-50 mV. Son potentiel d'inversion est situé entre -10 mV/-20 mV et il possède des propriétés compatibles avec la génération d'une activité répétitive et la modulation d'un rythme spontané.

L'attribution du rôle d' I_f dans le *pacemaker* a permis de réévaluer la phase de DD qui était jusque-là attribuée à une diminution d'un courant K^+ sortant (« I_K decay »).

Après 38 ans, de nombreuses données ont démontré qu' I_f est un constituant majeur du *pacemaker* et de la modulation du rythme. De plus, le courant I_f est devenu la cible des agents dit « bradycardisants » utilisés en clinique. Toutefois, I_f n'est pas le seul courant à être caractérisé comme responsable de l'automatisme.

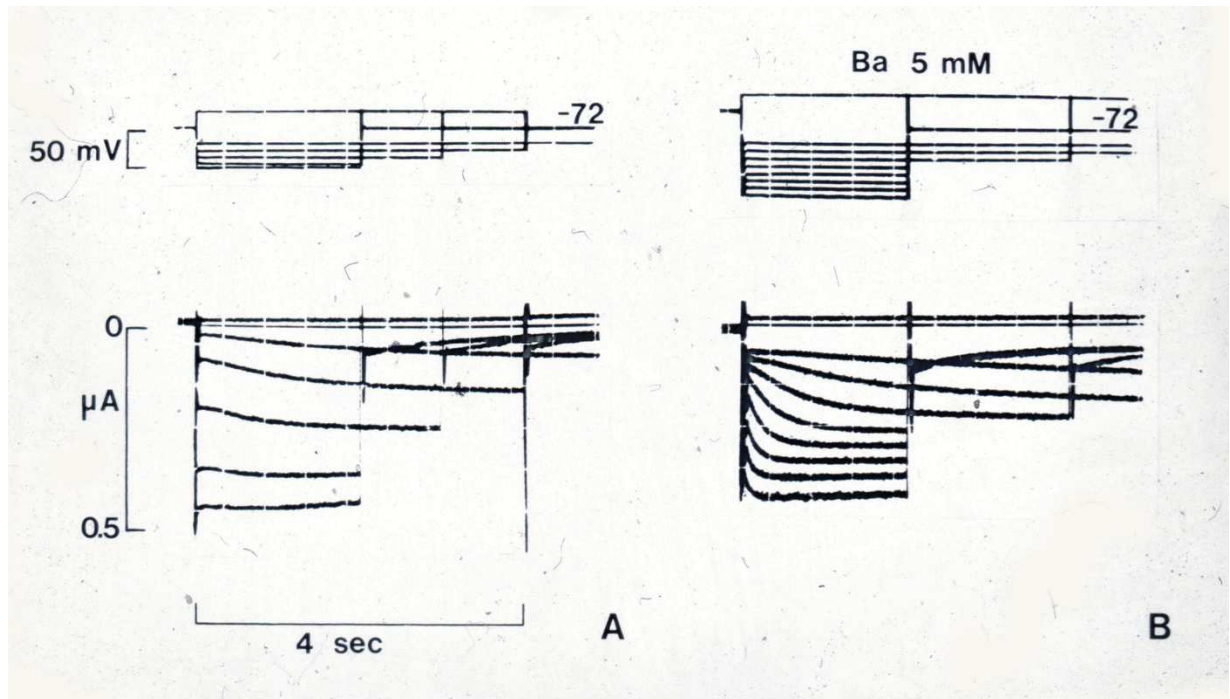


Figure 18 : Enregistrements de Dario DiFrancesco en 1980. Le potentiel d'inversion du courant activé dans la fenêtre du pacemaker est aboli quand I_{K1} est bloqué par le Ba (à droite). En haut à gauche, le protocole descendant à un voltage très bas induit un courant qui devient de plus en plus petit (en bas à gauche). En présence de Ba 5 mM, côté droit, même avec un protocole extensif qui descend le voltage jusqu'à -165 mV, il n'y a pas de potentiel d'inversion. DiFrancesco conclut que l'inversion dépendait d' I_{K1} . D'après DiFrancesco et al., 1980.

II.2.4 Discrimination d' $I_{Ca,T}$ et d' $I_{Ca,L}$ de N. Hagiwara

Le courant calcique I_{si} enregistré par H. Reuter en 1967 fût petit à petit redéfini comme un contributeur lui aussi de l'automatisme. Au début des années 80, de nombreuses recherches ont été axées sur la différenciation de ce courant I_{si} avec l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^+ (NCX) dans le but de compléter le modèle MNT. Le courant $I_{Na/Ca}$ (ou I_{NCX}) est lui aussi dépendant du Ca^+ .

L'importance d' I_{si} a été évaluée dans la DD ainsi que dans la régulation adrénérergique du pacemaking par les japonais A. Noma et collaborateurs (Noma, Irisawa et al. 1980, Noma, Kotake et al. 1980, Noma, Morad et al. 1983).

Le rôle et le fonctionnement d' I_{si} dans le *pacemaker* ont été investigués par d'autres protagonistes de la recherche dans ce domaine qui sont H. Brown, D. DiFrancesco et D. Noble (Brown, DiFrancesco et al. 1979) ou encore W.R. Giles et S. Shibata sur la grenouille (Giles and Shibata 1981).

En 1987, E. Carbone & H.D. Lux publient un article sur la différenciation de deux courants calciques caractérisés en *patch clamp* dans des neurones sensoriels chez l'embryon de rat et de poule (Carbone and Lux 1987). Ils identifient d'une part un courant calcique activé à un voltage bas appelé « *low-voltage-activated Ca^{2+} current* » (LVA), qui ne serait pas dépendant de la concentration en Ca^{2+} et plutôt sensible à des cations divalents Ni^{2+} et Cd^{2+} .

D'autre part, un deuxième courant calcique est activé à un voltage plus positif nommé « *high-voltage-activated Ca^{2+} current* » (HVA). Ces deux courants possèdent des cinétiques d'inactivation différentes à cause de leurs caractéristiques : les LVA sont simplement dépendants du voltage alors que les HVA sont simplement dépendants du Ca^{2+} ou doublement dépendants du Ca^{2+} et du voltage.

Dans la continuité d'E. Carbone & H.D. Lux, en 1988, N. Hagiwara et collaborateurs redéfinissent I_{si} dans le *pacemaker* grâce à des expériences de *patch clamp* sur des cNSAs de

lapin. En s'appuyant sur les suggestions d'autres chercheurs japonais des années 80⁵ montrant l'implication d' I_{Si} dans la DD et dans la phase exponentielle du potentiel d'action, N. Hagiwara et collaborateurs proposent qu' I_{Si} puisse contribuer à la DD de -60 mV à -40 mV, malgré son seuil d'activation à -40 mV.

N. Hagiwara et collaborateurs relatent qu'un courant calcique ayant un seuil d'activation plus bas a été détecté dans plusieurs types de cellule excitable comme dans les cellules cardiaques atriales (Bean 1985) ou ventriculaires (Nilius, Hess et al. 1985). Ils montrent dans les cNSAs qu'ils obtiennent ce courant en faisant varier la fenêtre d'activation de -80 mV à -50 mV. Dans cette fenêtre, les canaux calciques de type L ne sont pas activés alors que les canaux de type T le sont. Ils en déduisent qu' I_{Si} est composé de deux courants distincts, $I_{Ca,L}$ (canal calcique dépendant du voltage de type L à haut seuil d'activation, noté LTCC, HVA) et $I_{Ca,T}$ (canal calcique dépendant du voltage de type T à bas seuil d'activation, noté TTCC, LVA).

⁵ Yanagihara, Irisawa, Noma, Kotake, Kokubun, Nishimura & Morad.

II.2.5 Emergence de deux concepts/modèles de l'origine de l'automatisme cardiaque

Depuis les années 90, le mécanisme *pacemaker* sous-jacent de l'automatisme cardiaque a fait l'objet de nombreuses publications qui ont permis de mettre en évidence le rôle, les interactions et la régulation des courants ioniques impliqués dans la DD. A ces courants I_f , $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$ s'ajoutent d'autres éléments tels que la dynamique calcique intracellulaire autour du RS avec l'échangeur NCX et l'activité du RyR2, les TRPM, I_{st} , et $I_{Na}^{TTX-sensitive}$ qui seront décrits dans le chapitre suivant.

Le rôle de l'ensemble des canaux ioniques et de la libération de Ca^{2+} dans la genèse et la régulation du mécanisme *pacemaker* divise la communauté scientifique sur la base de deux concepts qui s'opposent:

- Le « **membrane clock** » ou « M clock » attribue la genèse du *pacemaker* à l'activité de l'ensemble des canaux ioniques à la surface de la membrane plasmique.
- Le « **Ca²⁺ clock** » l'attribue à la libération spontanée de Ca^{2+} sarcoplasmique localisée dépendante du RyR2 dans le milieu intracellulaire et indépendante du voltage.

Ces deux concepts ont été discutés en 2009 par D. DiFrancesco et E. Lakatta dans la publication « *JMCC Point-Counterpoint, What keeps us ticking, a funny current, a Calcium clock, or both ?* » (Lakatta and DiFrancesco 2009). Le prochain chapitre détaille chacun des deux concepts.

II.3 Controverse entre « M clock » et « Ca²⁺ clock »

II.3.1 « Membrane clock »

Il y a plus de 50 ans, S. Weidmann et collaborateurs ont attribué l'activité électrique cardiaque à l'excitation de la membrane puis D. Noble a émis l'hypothèse que des courants ioniques spécifiques guident spontanément la DD au seuil de déclenchement d'un PA. Cette hypothèse est appuyée par les nombreuses découvertes faites entre 1960 et 1980 qui ont permis d'échafauder la théorie du « *Membrane clock* ».

Ce modèle suppose que le *pacemaker* est généré par l'ensemble des courants ioniques à la surface de la cellule *pacemaker* (quel que soit le centre rythmogène où elle est localisée). L'activité *pacemaker* est considérée comme une oscillation dépendante de courants sortants repolarisants et de courants entrants dépolarisants qui fluctuent en fonction du temps. L'enchaînement de l'activation des canaux fonctionnerait comme une horloge pour initier spontanément le mécanisme qui régit le rythme et la fréquence cardiaque. La Figure 16 est une illustration des courants ioniques qui sont impliqués dans le *pacemaker*.

Actuellement, le courant I_f est considéré comme le mécanisme majeur impliqué dans le *pacemaker*, jusqu'à être surnommé le « courant *pacemaker* ». Il initie la DD grâce à son activation durant la repolarisation, mais les autres canaux qui seront décrits dans la prochaine partie, dont notamment les courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$, sont aussi indispensables au bon fonctionnement mécanique de l'horloge.

Les approches génomiques ont permis de définir des canalopathies touchant des canaux impliqués dans le pacemaking chez l'humain ainsi que la création de modèles animaux génétiquement modifiés. Pour conclure, le mécanisme *pacemaker* requiert indéniablement l'ensemble de ces canaux dépendants du voltage pour générer une activité correctement adaptée à la physiologie de l'organisme.

Le concept « *I_f maître du pacemaker* » défendu en première ligne par D. DiFrancesco est adopté puisqu'il incite au *design* de nouveaux outils thérapeutiques, inhibiteurs d' I_f , et inspire l'élaboration de *pacemaker* biologique par les chercheurs d'aujourd'hui.

II.3.2 « Ca^{2+} clock »

En 1989, D.S. Rubenstein et S.L. Lipsius ont montré que l'application de Ryanodine réduit la pente de la phase exponentielle de la DD des cellules *pacemaker* et en ont conclu que le stock de Ca^{2+} dans le RS a son importance dans la génération du *pacemaker* (Rubenstein and Lipsius 1989).

Sous la direction d'E. Lakatta, K.Y. Bogdanov, T.M. Vinogradova et collaborateurs ont étudié la dynamique calcique intracellulaire entre les canaux calciques voltage-dépendants, le RyR2 et l'échangeur NCX (Bogdanov, Vinogradova et al. 2001). Ils ont décrit cette dynamique initiée par la sortie de Ca^{2+} du RS dans le cytoplasme sous forme de « *Local Ca^{2+} release* » (LCR, identifiées comme des « *sparks* » en imagerie calcique) correspondant à l'activité du RyR2. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire due aux LCRs active le courant I_{NCX} entrant positif en échangeant les ions Ca^{2+} sortants avec des ions Na^{+} entrants avec un ratio 1/3.

Le concept du « *Ca^{2+} clock* » définit ces LCR comme l'élément générateur du *pacemaker* pendant la phase exponentielle de la DD à travers le courant I_{NCX} (Figure 19). Ce rôle non négligeable du Ca^{2+} a soulevé des interrogations sur la genèse du *pacemaker*. En effet, il a été montré que les LCR pouvaient avoir lieu sans dépolarisation de la membrane dans des cellules quiescentes (Vinogradova, Zhou et al. 2004) et que des cellules *pacemaker* pouvaient être stoppées (stoppe de PA) par un voltage imposé au maximum du potentiel diastolique sans pour autant arrêter les phénomènes de LCR qui restent périodiques et spontanément actifs.

Toutefois c'est l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule par les canaux calciques *pacemaker* $Ca_v1.3$ qui stimule le RyR2 du RS pour la décharge de son stock de Ca^{2+} en intracellulaire (voir $Ca_v1.3$ dans la synchronisation des LCR, page 119). Ce phénomène de « *Local Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release* » (LCICR) montre bien la dépendance des LCR et de la décharge du RS à $Ca_v1.3$ (Torrente, Mesirca et al. 2016).

Ces observations interrogent sur le rôle du « *Ca^{2+} clock* » en tant que mécanisme indépendant et spontané générant le *pacemaker*. Le « *Ca^{2+} clock* » est-il un mécanisme *pacemaker* en soi ou un simple élément de l'impulsion et de la modulation du mécanisme contrôlé par l'activité des canaux ioniques ?

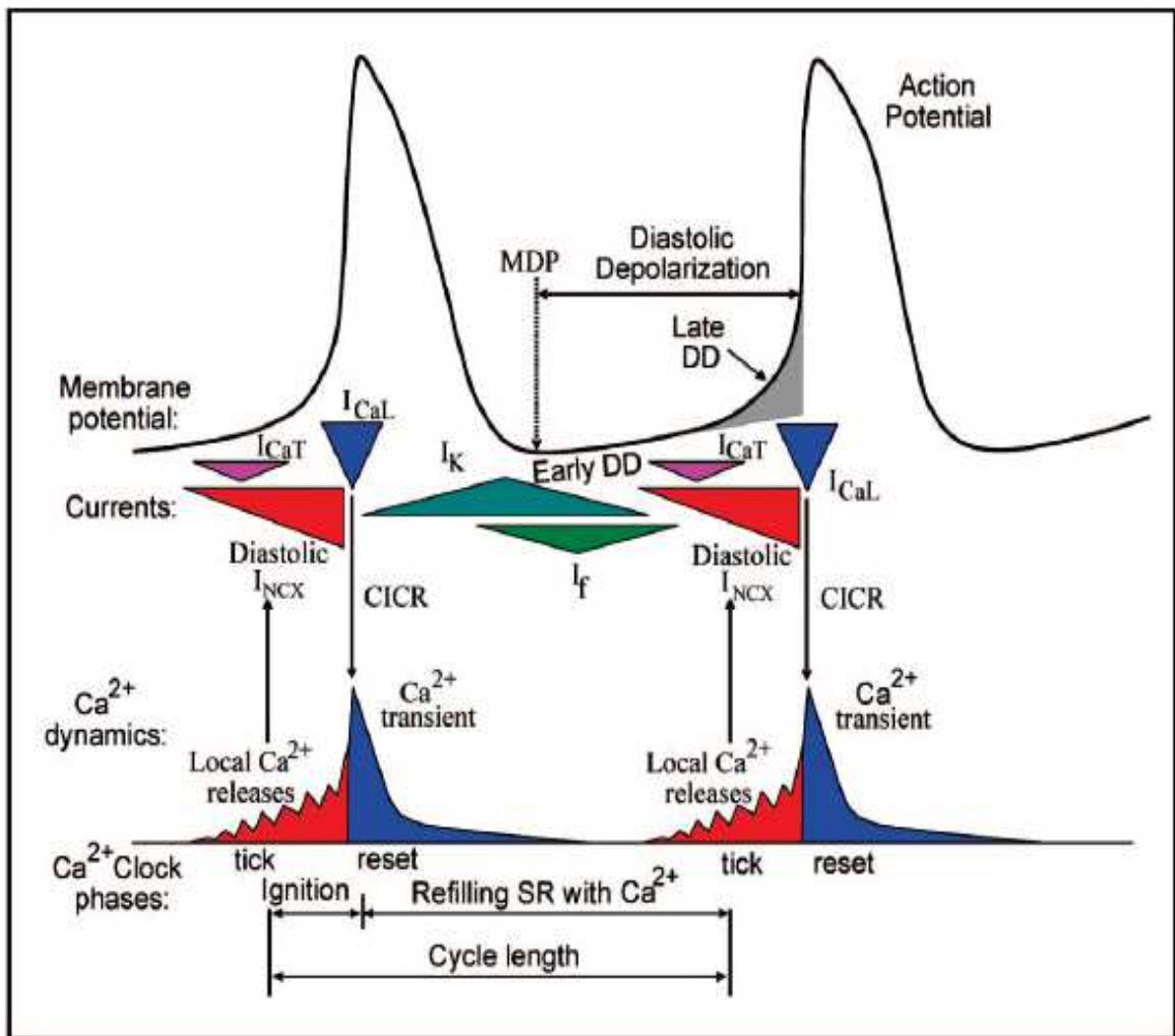


Figure 19 : Illustration de l'implication du Ca²⁺ clock (rouge) dans la phase exponentielle de la DD (late DD) du potentiel de membrane. D'après Lakatta et al. 2010.

D'un côté, le rôle de l'ensemble des autres canaux ioniques du « *membrane clock* » dans la genèse de l'activité pacemaker est soutenu par des preuves électrophysiologiques, pharmacologiques et génétiques.

D'un autre côté, l'importance de la libération de Ca^{2+} dans la génération de l'activité pacemaker est soulignée par l'inhibition pharmacologique du RyR2 dans les cNSAs qui réduit la réponse β -adrénergique de l'activité pacemaker (Vinogradova, Bogdanov et al. 2002).

Une partie de notre problématique se situe dans la compréhension de ce mécanisme complexe.

Partie III : Caractéristiques fonctionnelles des canaux ioniques et pathologies associées

Les pertes de fonctions d'HCN4, de $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ ont été reconnues comme responsables de SSS en pathologie cardiaque humaine. De ce fait, des modèles animaux génétiquement modifiés ont été conçus pour l'exploration fonctionnelle de ces canaux. L'étude de ces canaux dans le mécanisme fondamental du pacemaker par une caractérisation de ces modèles devrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies. Les caractéristiques de ces canaux et les modèles de pathologies associés sont exposés dans cette troisième partie.

III.1. I_{Na}

Depuis le début des années 80, deux courants I_{Na} fonctionnellement distincts ont été identifiés au sein du NSA (Brown, 1982). Ces courants sodiques I_{Na} dépendant du Na⁺ et du voltage participent au *pacemaker* dans les cNSAs.

Le pore de ces canaux est constitué d'une sous-unité α et d'une auxiliaire β (Catterall 2000). Leur caractère le plus distinctif est leur sensibilité à la Tétrodoxtine (TTX). L'I_{Na} sensible à la TTX (I_{Na} TTX-sensible) est dit « neuronal » et est généré par l'isoforme Na_v1.1. L'isoforme Na_v1.5, qui est plus ubiquitaire au niveau cardiaque, génère un courant résistant à la TTX « I_{Na}-résistant ». Na_v1.5 n'est pas exprimé dans le centre du NSA mais uniquement dans la zone paranodale où l'activité *pacemaker* semble plus dépendante d'I_{Na} que d'I_{Ca}.

Les mutations de type perte ou gain de fonction du gène *Scn5a* codant pour Na_v1.5 provoquent des pathologies du rythme diverses comme le SSS, la fibrillation auriculaire, le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long de type 3 et les blocs atrioventriculaires.

Le type Na_v1.1 dit neuronal, est exprimé dans le centre du NSA et dans les cellules musculaires atriales qui l'entourent. L'activation et l'inactivation d'I_{Na} sont lentes, autour de -70 mV/-60 mV avec un pic d'ouverture à -20 mV (Lei, Jones et al. 2004).

Des études sur le lapereau et la souris adulte ont montré que c'est l'I_{Na} TTX-sensible qui contribue au *pacemaker* alors qu'I_{Na}-résistant joue plutôt un rôle dans la conduction du signal dans l'oreillette. Par exemple, sur les cNSAs de lapereau enregistrées en *patch clamp*, M. Baruscotti et collaborateurs en 1996 ont relevé un ralentissement de l'activité *pacemaker* de 63 % en appliquant 3 μ M de TTX (Baruscotti, DiFrancesco et al. 1996). Dans cette condition, la phase exponentielle de la DD est ralentie et le seuil de déclenchement de PA ainsi que son amplitude sont diminués. Chez la souris, l'inhibition pharmacologique des deux I_{Na} par la Lidocaïne, ralentit le rythme cardiaque de la souris adulte par un allongement des intervalles PP, PR et la durée de l'onde P (Lande, Demolombe et al. 2001).

Il existe une variabilité intra et inter-espèces de l'expression de ces canaux. Pendant les 40 premiers jours après la naissance, l'expression de $\text{Na}_v1.1$ disparaît peu à peu chez le lapin, suggérant que sa fonction est de favoriser le *pacemaker* basal chez le nouveau-né.

M. Lei, S. Maier et collaborateurs, en 2003 et 2004 ont étudié l'effet et le dosage de la TTX sur l'activité *pacemaker* de la souris (Maier, Westenbroek et al. 2003, Lei, Jones et al. 2004). Une faible dose allant de 10 à 100 nM de TTX en perfusion sur le cœur isolé ou des cNSAs permet d'inhiber spécifiquement $\text{Na}_v1.1$. Ils ont observé un ralentissement du *pacemaker* sans altération de la conduction du signal. L'intervalle PP du cœur entier isolé intact diminue d'environ 65 %, l'activité *pacemaker* du tissu sinusal isolé de 22 % et 15 % dans les cNSAs. L'effet de cette faible dose de TTX est similaire à celui observé par Baruscotti et collaborateurs sur le lapereau. Par contre, une dose de l'ordre du micromolaire de TTX (1 à 30 μM) bloque également $\text{I}_{\text{Na-résistant}}$, ralentissant par conséquent le *pacemaker* et la conduction.

Des souris mutantes hétérozygotes pour $\text{Na}_v1.5$ appelées $\text{Scn5a}^{+/-}$ présentent des dysfonctions de la conduction AV, des tachycardies ventriculaires, ainsi qu'une bradycardie modérée et arythmique qui n'est pas retrouvée sur le tissu sinusal isolé (Papadatos, Wallerstein et al. 2002). Les NSA isolées des tissus de souris $\text{Scn5a}^{+/-}$ présentent une activité *pacemaker* normale en son centre malgré des défauts de conduction et des blocs de sortie. Ceci démontre que $\text{Na}_v1.5$ ne participe pas à la génération de l'automatisme au niveau du NSA central mais peut influencer le rythme cardiaque à cause de sa contribution dans la conduction intra et extra-nodale.

III.2 Etude fonctionnelle d'I_f

III.2.1 Caractéristiques d'I_f

Des années 70 à nos jours, D. DiFrancesco et collaborateurs ont œuvré dans la caractérisation électrophysiologique d'I_f et fait face à de nombreuses critiques (Irisawa, Brown et al. 1993). Mais il est désormais indéniable que le rôle d'I_f est d'assurer un cycle spontané de génération de PA en initiant la DD à la fin de chaque PA dans les cellules *pacemaker*.

Propriétés

Le courant I_f pour « *funny current* » se nomme ainsi à cause de sa propriété d'activation particulière. D'une part, ce courant est activé par l'hyperpolarisation de la membrane de la cellule et son seuil d'activation est de -40/-50 mV. Son potentiel d'activation se trouve pendant la phase de repolarisation guidée par I_K. I_f et I_K s'opposent jusqu'au début de la DD où I_f amorce la dépolarisation jusqu'à l'activation des canaux calciques de la phase exponentielle de la DD (Mangoni and Nargeot 2008). I_f est inhibé par le Césium (Cs⁺) et dépend de la concentration intracellulaire de Na⁺ ou K⁺ (DiFrancesco and Noble 1985).

Les canaux HCN codent pour le courant I_f (principalement l'isoforme HCN4 dans les cellules *pacemaker* du NSA), ils sont perméables au Na⁺ et au K⁺ avec une préférence pour le Na⁺. Le courant généré pendant la phase lente de la DD est entrant jusqu'au potentiel d'inversion (E_{rev}) à -10/-20 mV. A des potentiels plus positifs que l'E_{rev}, I_f devient un courant sortant de charge positive jusqu'à la fin de la DD (DiFrancesco 2010), (DiFrancesco 1985).

Structure

La mise en évidence des gènes qui codent pour les 4 isoformes d'HCN 1-4 a fait considérablement avancer la recherche. Structurellement (Figure 20), chaque canal HCN

fonctionnel est composé de 4 sous-unités qui contiennent chacune 6 domaines transmembranaires S1-S6 ainsi qu'un domaine CNBD composé de 8 brins β entourés de 4 hélices α pour l'accueil de l'AMPc (Santoro, Liu et al. 1998).

C'est le domaine transmembranaire S4, qui est sensible au voltage dans les 4 isoformes. La séquence du pore GYG détermine la perméabilité du canal (Xue, Marban et al. 2002). Les segments S5 et S6 constituent le domaine P qui permet la conduction et la sélectivité des ions (Biel, Schneider et al. 2002). Les séquences primaires des 4 isoformes sont hautement conservées à travers la membrane alors que les domaines N et C terminaux sont plus divergents. D'après C. Viscomi et collaborateurs 2001, cette divergence serait à l'origine de la différence de cinétique, de seuil d'activation et de modulation par des nucléotides cycliques pour chaque isoforme (Viscomi, Altomare et al. 2001). Par exemple HCN1 a une activation plus rapide et une plus faible sensibilité à l'AMPc (Ludwig, Zong et al. 1998, Santoro, Liu et al. 1998) alors qu'HCN4 a une forte sensibilité à l'AMPc mais une cinétique d'activation lente (Ludwig, Zong et al. 1999). Quant à HCN2, c'est un intermédiaire entre les deux (Moroni, Barbuti et al. 2000) et HCN3 n'est pas modulable par l'AMPc (Mistrik, Mader et al. 2005).

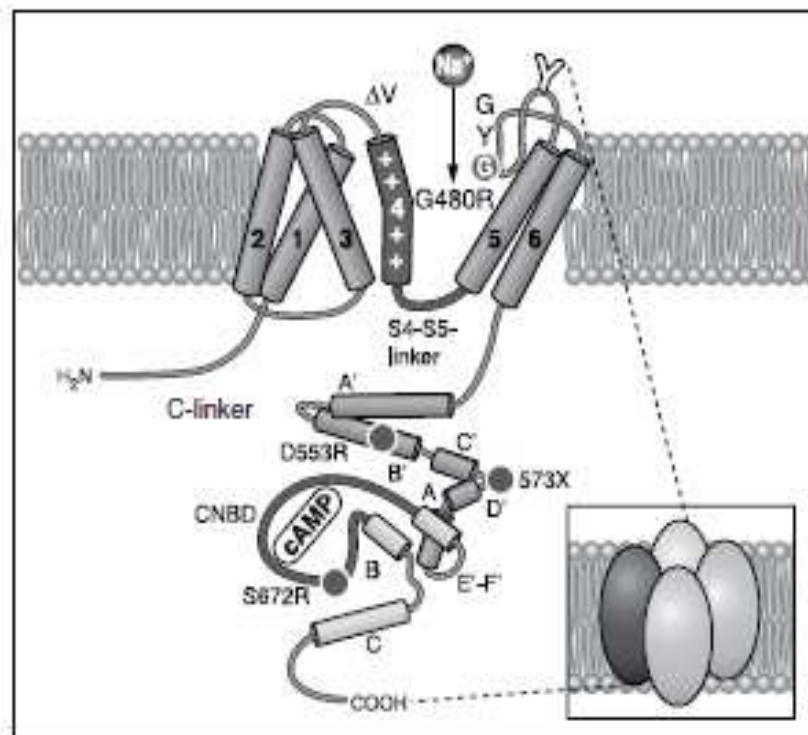
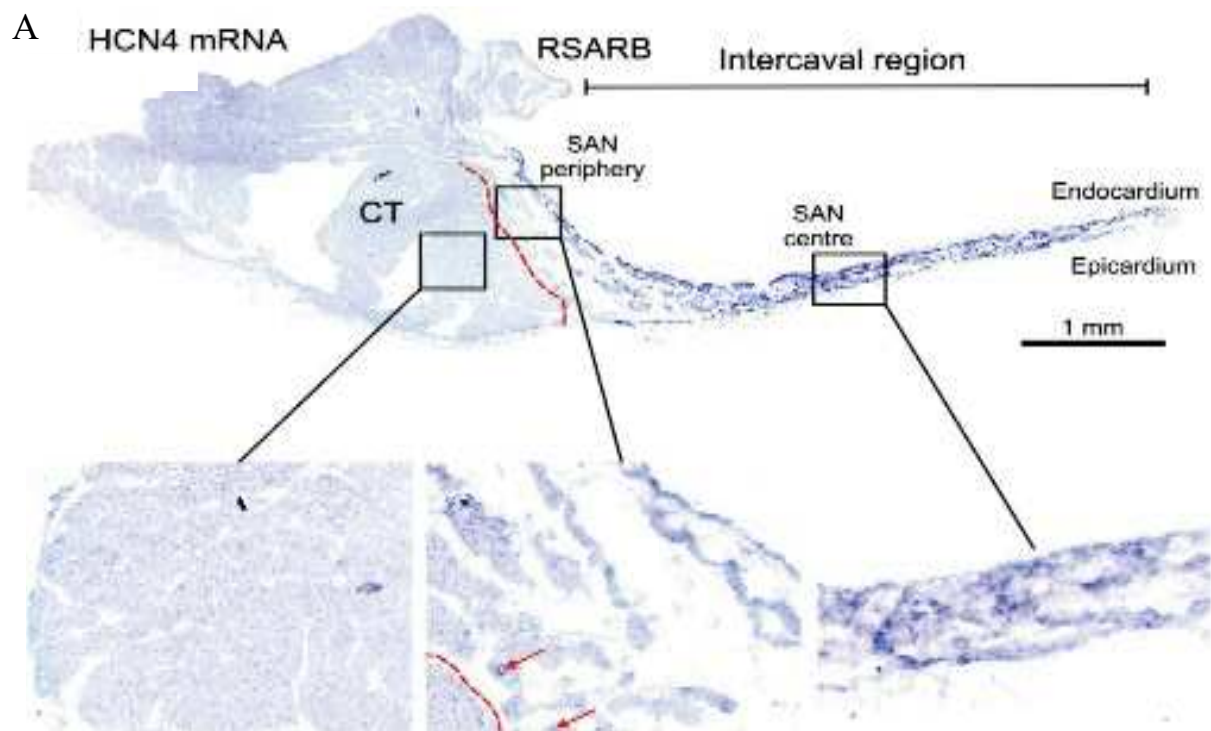


Figure 20 : Structure tétramérique du canal HCN. Le domaine C terminal est composé d'un « C-linker » et d'un CNBD pour la fixation à l'AMP cyclique. D'après Biel et al., 2009.

Expression des canaux HCN dans le cœur adulte

La distribution des 2 isoformes cardiaques d'HCN est très spécifique : HCN4 est l'isoforme la plus exprimée et la plus importante dans le centre du NSA (80 % HCN4, 20 % HCN1, (Figure 21)) chez tous les modèles animaux étudiés (chien, souris, lapin). La délétion d'HCN4 induit une diminution de 75 % du courant I_f dans les cNSAs. Inversement dans le cerveau, c'est HCN1 qui est majoritairement exprimée (Ishii, Takano et al. 1999, Shi, Wymore et al. 1999, Moosmang, Stieber et al. 2001, Tellez, Dobrzynski et al. 2006).

Dans le NAV, le profil d'expression des HCNs est similaire à celui du NSA, avec l'expression additionnelle d'une faible quantité d'HCN2. Au niveau ventriculaire, c'est l'isoforme HCN2 qui prédomine, suivi d'HCN4 et d'un peu d'HCN1. HCN3 est très peu exprimée au niveau du cœur adulte (Stieber, Herrmann et al. 2003, Marionneau, Couette et al. 2005) mais elle l'est fortement dans le cœur embryonnaire. La présence d'HCN dans les ventricules et les oreillettes suggère l'existence d'un courant I_f , mais le seuil d'activation dans ces tissus est plus négatif que dans le NSA ou le NAV. En effet, I_f est activé à un seuil de -113 mV dans la cellule ventriculaire de la souris adulte, sa probabilité d'activation est donc largement diminuée. HCN2 a néanmoins son importance puisque sa délétion induit des dysrythmies cardiaques (Ludwig, Budde et al. 2003). C'est le déplacement du seuil d'activation qui provoque des pathologies (Robinson, Yu et al. 1997).



B

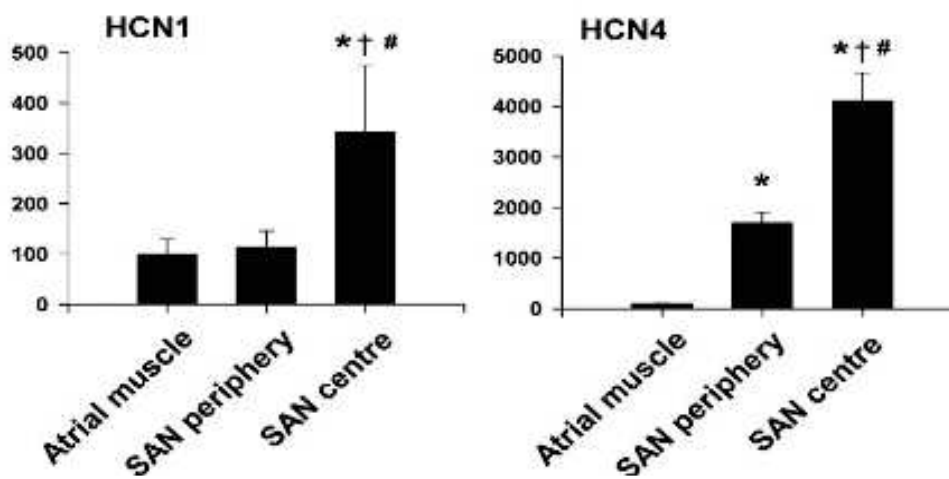


Figure 21 : Expression d'HCN4 dans le NSA. A : Image de l'hybridation in situ d'ARNm d'HCN4. B : Degré d'expression des ARNm d'HCN1 et d'HCN4 dans le NSA central, la zone paranodale et l'oreillette. D'après Tellez JO et al., 2006.

Modulation d'HCN

En 1979, H. Brown montre qu' I_f est sensible à la stimulation β -adrénergique du système nerveux autonome (Brown, DiFrancesco et al. 1979) et prouve que ce courant est un acteur majeur dans la modulation du *pacemaker* (Mangoni and Nargeot 2008, DiFrancesco 2010). Ses modifications électrophysiologiques se répercutent sur la densité du courant I_f et la fréquence des PA (DiFrancesco and Tromba 1988, DiFrancesco and Tromba 1988).

La modulation s'effectue à plusieurs niveaux :

- **Régulation par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)**

I_f est directement sensible à la $[AMPc]_i$ via le domaine CNBD (« *Cyclic nucleotide-binding domain* ») d'HCN. L'activité de la voie β -adrénergique via le récepteur β_2 augmente la production d'AMPc (à partir d'adénosine triphosphate, ATP) dans la cellule en activant l'adénylate cyclase (AC) (DiFrancesco and Tortora 1991). L'AMPc augmente la probabilité d'ouverture du canal HCN en déplaçant son seuil d'activation à un voltage plus positif (Figure 22A) pour un effet chronotrope positif. D. DiFrancesco a montré en 1993 que la stimulation par l'agoniste β -adrénergique Isoprénaline (ISO) facilite l'ouverture du canal et induit une augmentation de la pente de la DD. En revanche, l'ISO n'a pas d'effet sur le seuil de déclenchement du PA qui reste inchangé (DiFrancesco 1993) (Figure 22B). En opposition, l'activité de la voie parasympathique provoque un effet chronotrope négatif en libérant de l'Acétylcholine (ACh). L'ACh active les récepteurs muscariniques (M_2) qui inhibent l'AC et la production d'AMPc. Par convention, il résulte un déplacement du seuil d'activation du canal vers un potentiel plus négatif et donc, une diminution de la pente de la DD induisant un ralentissement de décharge de PA.

- **Régulation par les kinases**

La protéine kinase dépendante de la concentration en AMPc (PKA) serait capable d'activer HCN dans le NSA. D'après Z. Liao et collaborateurs, HCN4 possède 13 sites de phosphorylation pour la PKA (Liao, Lockhead et al. 2010). La phosphorylation de la thréonine

et de la sérine localisées sur la partie C-terminale d'HCN4 par la PKA déplace le potentiel d'activation d' I_f à un seuil plus positif. Sur des cellules *pacemaker* isolées de souris, l'inhibition de la PKA par une PKI (« *protein kinase inhibitor* ») diminue significativement l'effet d'une stimulation β -adrénergique sur I_f .

I_f est également régulé par une autre voie moins connue qui a été mise en évidence bien plus tard dans les années 2000 (Zong et al. 2005 & Arinsburg et al. 2006). C'est une voie de phosphorylation d'HCN par la serine/thréonine kinase p38 et la tyrosine kinase Src. La phosphorylation du résidu tyrosine Y554 d'HCN déplace la courbe d'activation d' I_f positivement et la phosphorylation du résidu Y531 régule l'action de Src (Li, Zhang et al. 2008). Des études effectuées sur des ovocytes de *Xenopus* ou des cardiomyocytes ventriculaires isolés montrent que les HCNs ont plusieurs liens avec d'autres molécules pour leur modulation tel que PIP2 (Pian, Bucchi et al. 2006), *MinK-related peptide 1* (Yu, Wu et al. 2001) ou encore TRIP8b (Santoro, Wainger et al. 2004). Mais ces interactions semblent avoir un impact fonctionnel limité tant la régulation directe par l'AMPc est importante et immédiate.

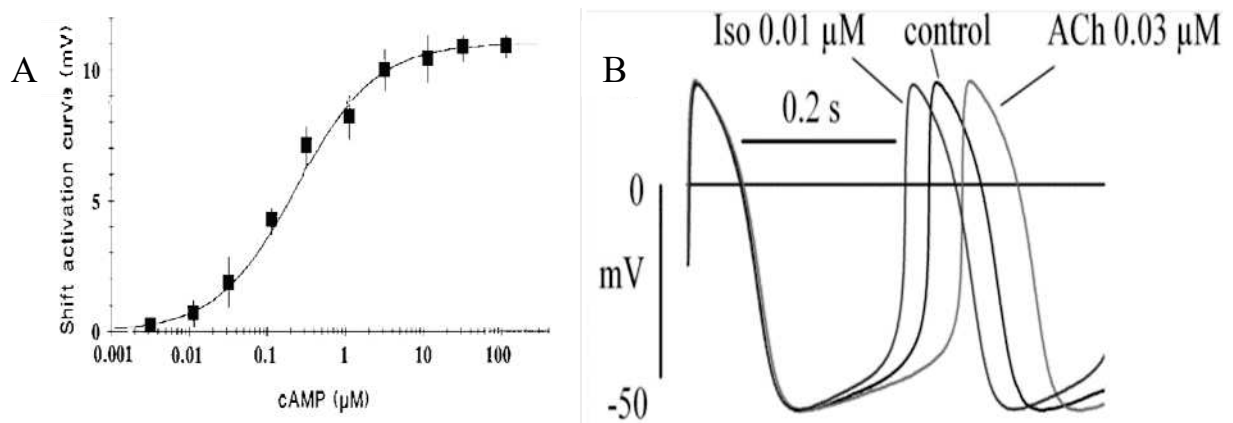


Figure 22 : A : Courbe du déplacement du seuil d'activation d' I_f en fonction de la concentration en AMPc (Di Francesco et al. 1991). B : Tracés enregistrés en patch clamp montrant le potentiel de membrane de cNSA de lapin sous l'effet chronotrope positif de l'ISO et négatif de l'ACh. D'après Di Francesco et al. 1993.

III.2.2 Dysfonction génétique chez l'homme

L'association entre les cardiopathies de type SSS et un dysfonctionnement d'HCN4 est connue depuis plus de 10 ans (Ueda, Hirano et al. 2009). Chez l'humain, des études ont révélé le dysfonctionnement d' I_f dans plusieurs pathologies, touchant précisément HCN4.

Quelques exemples de mutations identifiées chez l'homme:

- un patient présentant une bradycardie idiopathique du sinus, elle est causée par un défaut de codage de la séquence d'HCN4 (mutation hétérozygote HCN4-L573X). Son expression traduit une protéine tronquée sans le motif CNBD qui rend le canal insensible à l'AMPc. En conséquence, le seuil d'activation est à un potentiel plus négatif, ce qui diminue la DD (Schulze-Bahr, Neu et al. 2003).
- les membres d'une famille développent des arythmies cardiaques de type bradycardie, un long intervalle QT (LQT), une CPVT (« *Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia* ») ainsi que des torsades de pointe (TdP). La cause est une mutation faux-sens (D553N) entre le segment S6 et le CNBD d'HCN4. La conséquence est une diminution de l'expression d'HCN4 et le dysfonctionnement d'une protéine de transport (Ueda, Nakamura et al. 2004).
- une troisième mutation a été identifiée dans une famille en Italie où 15 individus sur 27 sont atteints de bradycardie. La mutation touche aussi le site CNBD et provoque une diminution de la sensibilité à l'AMPc (Milanesi, Baruscotti et al. 2006). Le résidu S672 touché est un possible site de phosphorylation d'HCN4 (Liao, Lockhead et al. 2010).
- ces derniers cas altèrent le CNBD mais d'autres composants mutés sur I_f peuvent être arythmogènes. Il existe d'autres composants auxiliaires d'HCN4 comme MiRP1 ou la caveoline-3. MiRP1 est une sous-unité β de canal K^+ hERG qui interagit avec HCN4. Une mutation sur cette sous-unité réduit le courant K^+ et induit un LQT chez les patients. Le SSS peuvent être observés chez ces patients. De ce fait, des analyses sur l'effet d'une

MiPR1 mutée sur les canaux HCN ont été réalisées et montrent une diminution d'I_f (Nawathe, Kryukova et al. 2013).

- dernièrement, l'équipe Milanaise de D. DiFrancesco a de nouveau montré l'implication d'I_f dans une pathologie du sinus : la tachycardie sinusale inappropriée (« *inappropriate sinus tachycardia* », IST). Les symptômes sont, par définition, une tachycardie sinusale ainsi qu'une réponse exacerbée à une stimulation provoquant des palpitations cardiaques, des syncopes et étourdissement ainsi qu'une intolérance orthostatique. Cette fois-ci, la mutation R524Q sur le CNBD d'HCN4 observée chez plusieurs individus est une mutation « gain de fonction ». Elle rend plus sensible HCN4 et par conséquent le *pacemaker* à l'AMPc (Baruscotti, Bucchi et al. 2017).

Plusieurs mutations génétiques touchent le motif CNBD lié à l'AMPc et atteignent directement l'activité *pacemaker*, entraînant des dysfonctionnements. Cette modulation d'HCN semble donc primordiale pour la régulation mais également pour le contrôle de l'automatisme.

III.2.3 L'Ivabradine

Paradoxalement aux conséquences de la perte de fonction d' I_f sur l'activité *pacemaker*, la recherche d'un inhibiteur pharmacologique ciblant spécifiquement ce courant fût accomplie pour traiter d'autres pathologies cardiaques.

Dario DiFrancesco montre en 1993 que les canaux f - sont bloqués par le Cs^+ en fonction du voltage, le blocage est en effet plus faible à des potentiels plus positifs. Durant les deux décennies qui ont suivi, d'autres inhibiteurs plus spécifiques et plus efficaces que le Cs^+ ont été développés tels que le Rubidium (Rb^+) (DiFrancesco 1982), le 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) (DiFrancesco, Porciatti et al. 1991), la Clonidine (Knaus, Zong et al. 2007) et le Propofol (Cacheaux, Topf et al. 2005) mais restent loin d'avoir une sélectivité suffisante.

Une molécule appelée « agent pur bradycardisant » définie comme étant très spécifique d' I_f et diminuant la DD et le rythme cardiaque a été développée. Plusieurs versions ont été développées et une seule a passé les essais cliniques, l'Ivabradine (IVA).

L'IVA est un bloqueur de « canaux ouverts » c'est-à-dire que la molécule a besoin que le canal soit ouvert pour le bloquer. Elle est très dépendante du voltage et son action est plus efficace lors de la phase de dépolarisation (Bois, Bescond et al. 1996), (Bucchi, Baruscotti et al. 2002).

L'IVA est chargée positivement et son site de fixation se situe au niveau du pore d'HCN, un blocage efficace dépend aussi des courants Na^+ et K^+ . En effet, quand un courant positif sort de la cellule, l'IVA rejoint son site de fixation et bloque au maximum le canal, alors que pendant l'hyperpolarisation, un courant entrant peut enlever la molécule du canal bloqué (Bucchi, Baruscotti et al. 2002).

L'IVA est commercialisée sous le nom de Procoralan© et Corlentor ©. Elle a testée sur des patients souffrants de maladies coronariennes ou de dysfonctionnement du ventricule droit (Fox, Ford et al. 2008). Ces tests furent concluants et l'IVA a été commercialisée en 2008.

III.2.4 Souris génétiquement modifiée

L'obtention de souris transgéniques fut délicate à cause de l'importance des HCN dans le développement embryonnaire : en effet, les KO d'HCN4 causent une létalité entre le 9^{ème} et le 11^{ème} jour de gestation (Stieber, Herrmann et al. 2003).

En 2008, D. Harzheim et collaborateurs choisissent de créer une souris génétiquement modifiée avec une mutation hétérozygote (R669Q) sur le domaine CNBD puisque la plupart des pathologies observées chez l'homme touchent ce domaine. Ces souris développent un rythme cardiaque normal mais subissent la stimulation adrénergique induite par les catécholamines en développant des pauses et des blocs sinusaux (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008).

De nouvelles techniques de modification génétique, le KO conditionnel, ont permis d'induire une mutation à un instant donné, en l'occurrence grâce à l'expression génétique d'une recombinase « *cre* » activée par le Tamoxifène. La recombinase « *cre* » excise l'allèle d'intérêt codant pour HCN4 entouré par des sites loxP. Ce KO est conditionné par l'injection de Tamoxifène qui supprime HCN4 en une semaine. L'analyse de l'ECG de ces souris HCN4^{-/-} adultes ne montre pas de changement de rythme cardiaque en condition normale et en stimulation à l'ISO, mais des pauses du NSA peuvent apparaître. Au niveau cellulaire, I_f enregistré en *patch clamp* est réduit de 75 % et les réponses muscariniques et adrénergiques sont efficaces. En revanche, 90 % des cNSAs ne déclenchent pas de PA spontanément à cause d'une hyperpolarisation de leur potentiel de membrane ; dans les 10 % restant, il y a une réduction de la LDD.

En 2011, notre groupe avec L. Marger porte ses travaux sur le NAV et s'intéresse plus particulièrement à la dépendance de la régulation du *pacemaker* à l'AMPc dont I_f est un élément clé (Marger, Mesirca et al. 2011). La lignée de souris utilisée est appelée hHCN4-573X, et présente une mutation dominante négative sur HCN4 induisant une insensibilité de ce canal à l'AMPc. Cette souris subit un déplacement de la courbe d'activation d'I_f qui réduit son activité fonctionnelle en condition de voltage diastolique physiologique. Sur des cellules *pacemaker* du NAV (cNAV) enregistrées en *patch clamp*, la mutation n'affecte pas la densité d'I_f mais la perfusion de 0.1 µM d'ISO n'a pas d'effet sur lui. En condition *current clamp*, ces cellules

montrent une fréquence de PA irrégulière et d'amplitude réduite, ainsi qu'un potentiel de membrane plus positif de +9 mV. Cette observation montre l'importance de l'AMPc dans l'excitabilité basale de l'activité *pacemaker*.

L'application d'une dose sous-maximale de 2 nM d'ISO augmente l'activité *pacemaker* des cNAVs chez les *WT* et les mutantes hHCN4-573X, sous-entendant que l'accélération de l'activité ne dépend pas que d'HCN4. A la dose saturante d'ISO 0.1 μ M, l'amplitude des PAs et le potentiel maximal diastolique sont identiques dans les cNAVs mutants et sauvage (*wild-type* noté *WT*).

Plus récemment en 2014, P. Mesirca de notre équipe a utilisé une souris avec une construction génétique de type « Tet-Off ». Ces souris, nommées hHCN4-AYA, expriment un transactivateur dépendant de la Tétracycline (tTA) contrôlée par un promoteur α MHC⁶. Chez les souris mutantes, le canal tagué HA-hHCN4-AYA est exprimé de façon conditionnelle en présence de Doxycycline (DOX). Afin de contrer l'effet létal de l'homozygote négatif pour HCN4 lors du développement, de la DOX est ajoutée dans l'eau avec laquelle s'abreuvent les souris gestantes et également dans l'eau de sevrage des nouveau-nés. L'arrêt de l'administration de DOX permet de stopper l'expression d'HCN4 chez la souris à partir de 4 semaines.

La construction génétique dans le génome de ces souris permet donc d'obtenir des souris KO pour HCN4 dont le développement n'est pas affecté par la mutation. Les souris adultes présentent les mêmes symptômes observés chez l'humain souffrant d'une mutation sur HCN4, à savoir une altération du fonctionnement du NSA caractérisée par une bradycardie modérée ainsi que des AVBs associés à des tachycardies ventriculaires.

⁶ α -myosin heavy chain promoter.

III.3 Les canaux calciques voltage-dépendants

Le Ca^{2+} est un ion important dans les myocytes cardiaques, d'une part *vis-à-vis* du couplage excitation-contraction et de l'homéostasie calcique, d'autre part *vis-à-vis* du mécanisme *pacemaker*. Les canaux calciques voltage-dépendants (VDCCs, VGCCs) sont au centre de l'automatisme cardiaque. Ils sont activés pendant la DD et leurs dysfonctionnements provoquent le SSS (Baig, Koschak et al. 2011). Les canaux calciques de type L (LTCC) et de type T (TTCC) sont exprimés dans le NSA central. L'isoforme de LTCC $\text{Ca}_v1.3$ est spécifique des centres rythmogènes et $\text{Ca}_v1.2$ est ubiquitaire dans le muscle cardiaque. Le TTCC $\text{Ca}_v3.1$ est exprimé dans les oreillettes et le tissu conducteur mais c'est dans le NSA que sa densité est la plus forte ($>15\text{A/F}$) (Fermini and Nathan 1991).

III.3.1 Caractéristiques des VDCC

$\text{Ca}_v1.3$ et $\text{Ca}_v3.1$ génèrent respectivement les courants $I_{\text{Ca,L}}$ et $I_{\text{Ca,T}}$ de la DD. Ces deux courants sont différenciables de par leur seuil d'activation, leur cinétique (Figure 23) et leur sensibilité à des molécules sélectives.

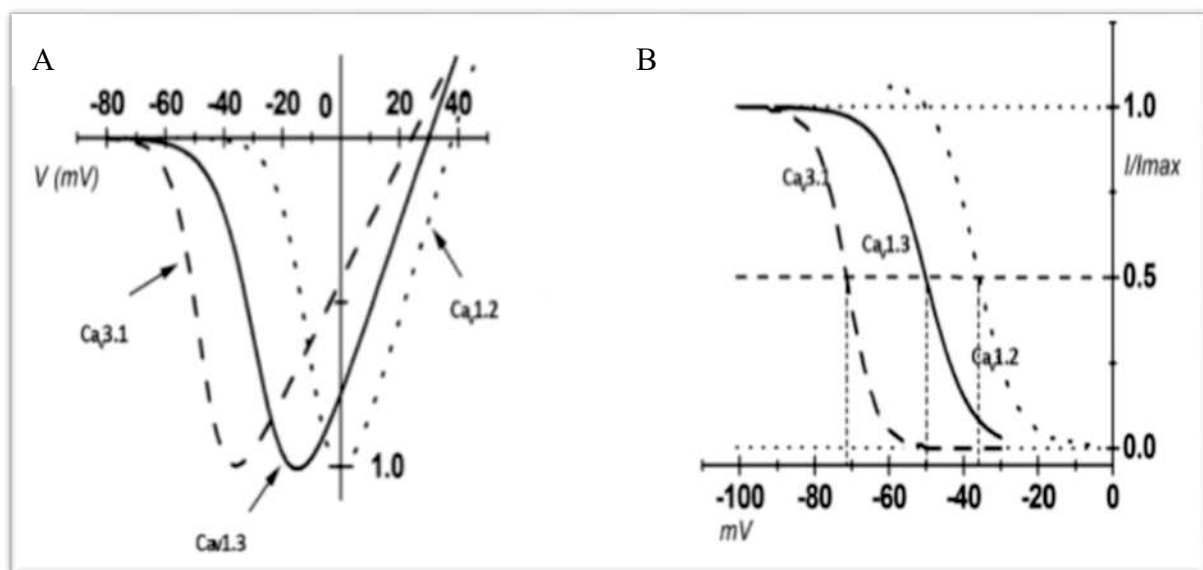


Figure 23 A : Courbes I-V des VDCC $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v3.1$. B : Courbes d'inactivation des VDCC enregistrées sur cNSA de souris. D'après Mangoni et al., 2006.

Propriétés des LTCC

L'isoforme $Ca_v1.3$ a un seuil d'activation à -50 mV avec un pic d'activation autour de -10 mV et l'isoforme $Ca_v1.2$ a un seuil d'activation plus positif à -30 mV avec un pic d'activation autour de 0 mV. $Ca_v1.1$ et $Ca_v1.4$ n'étant pas exprimés dans le cœur ($Ca_v1.1$ dans le muscle squelettique et $Ca_v1.4$ dans la rétine), leurs caractéristiques ne sont pas discutées.

Les LTCC sont sensibles à des bloqueurs spécifiques qui sont les Dihydropyridines (DHPs, la Nifedipine par exemple), les phénylalkylamines et les benzothiazepines. Il existe également des agonistes activateurs comme par exemple le BayK8644 (Mangoni, Couette et al. 2006). En comparaison avec $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ s'active plus rapidement et à un potentiel de membrane plus bas, ce sont ces propriétés qui permettent à $Ca_v1.3$ de favoriser la DD des cNSAs. $Ca_v1.2$ joue un rôle dans la phase ascendante du PA, après la DD.

Structure des LTCC

Les LTCC sont constitués d'un pore sensible au voltage formé d'une sous-unité $\alpha 1$. Il existe 10 isoformes de sous-unité α codées par des gènes différents. Ce sont ces unités qui vont servir de fondation aux VDCCs et déterminer leurs propriétés d'ouverture et pharmacologique. A cette sous-unité $\alpha 1$ s'associe un complexe hétéro-oligomérique comprenant des sous-unités auxiliaires dont la sous-unité β . Egalement des sous-unités $\alpha 2\delta$ sont amarrées à la face externe de la membrane de la cellule et à $\alpha 1$ par des glycolipides. La forme prédominante de sous-unité β dans les LTCC est $\beta 2$ (Marionneau, Couette et al. 2005). Cette sous-unité est indispensable à l'expression des LTCC, leur dégradation, ouverture et régulation (Buraei and Yang 2013). Les LTCC sont impliqués dans des voies de signalisation intracellulaire indispensables dans les fonctions métaboliques. Une sous-unité $\alpha 1$ sensible au voltage est composée de 4 domaines transmembranaires homologues S1-S4, dont le segment S4 chargé positivement bouge lors de la dépolarisation. Ce mouvement est transmis au segment S5 constituant le pore pour son ouverture. Le pore est formé de 2 domaines transmembranaires S5-S6 reliés par une région hélicoïdale jouant le rôle de filtre sélectif. Le domaine de modulation des LTCC est la région C-terminale rattachée à la sous-unité $\alpha 1$ où s'effectuent plusieurs interactions entre protéines. Cette région varie entre les isoformes des LTCC (Figure 24, Zucotti et al. 2011).

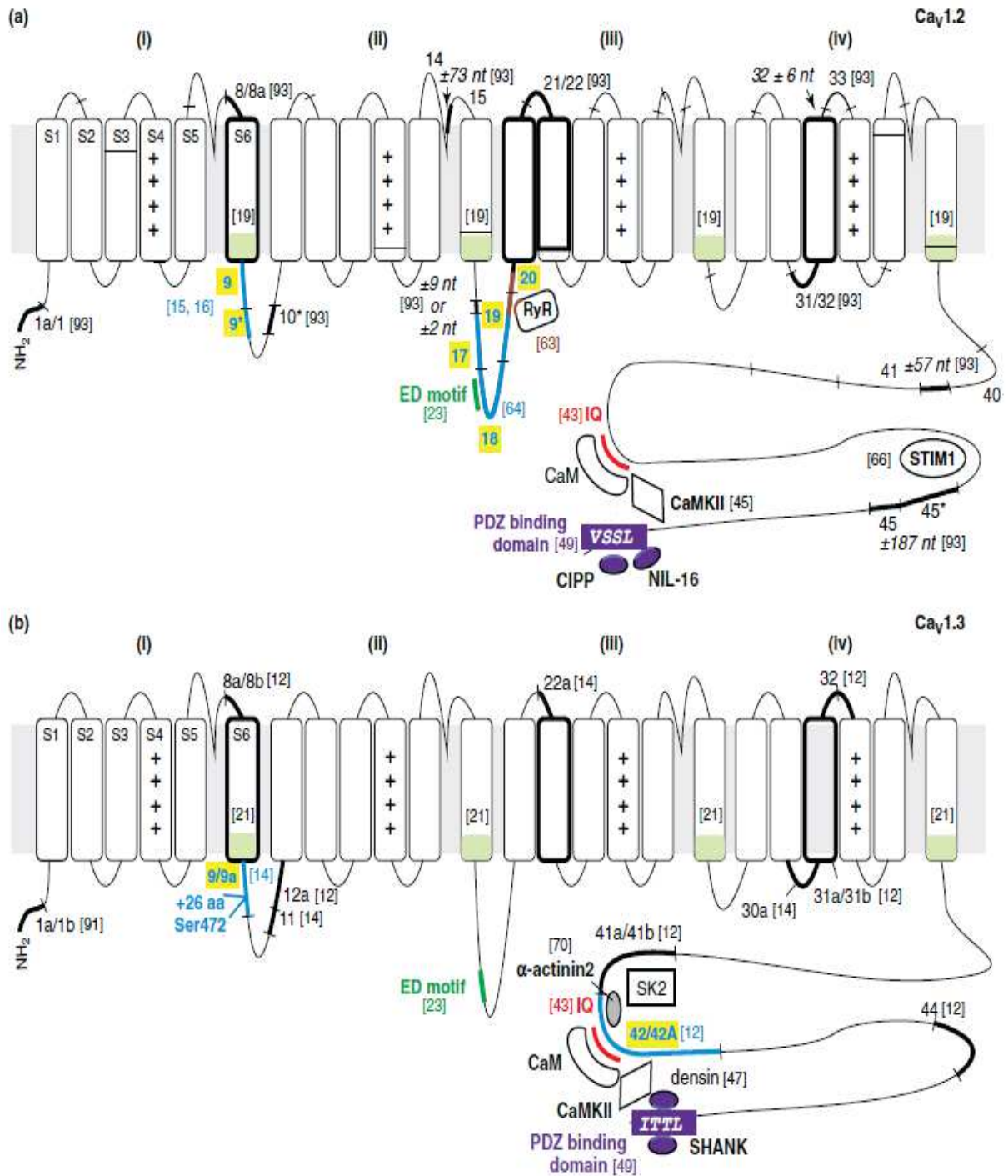


Figure 24 : Schéma structurel et fonctionnel de Ca_v1.2 (a) et Ca_v1.3 (b). La sous-unité α₁ est dépliée pour chacun des canaux avec les 4 domaines transmembranaires I-IV et les 6 segments S1-S6 qui les composent. La région du pore est entre S5 et S6 et le segment S4 est chargé positivement (++++). Les motifs verts sur les S6 indiquent les régions sensibles au voltage. Les variants d'épissage sont surlignés en noir et bleu lorsqu'ils différencient Ca_v1.2 et Ca_v1.3. L'épissage différentiel de l'exon 9 est la cause du seuil d'activation plus négatif de Ca_v1.3. Le domaine IQ pour la fixation de la CaM est en rouge. Le domaine PDZ de Ca_v1.3 permet l'interaction de Densin pour la CaMKII et d'autres protéines comme SHANK qui sont exprimées dans d'autres types cellulaires que des cellules pacemaker. D'après Zucotti et al., 2011.

Expression des LTCC

$Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ sont les deux isoformes cardiaques exprimées à partir du stade embryonnaire. $Ca_v1.2$ est exprimé dans la totalité du cœur alors que $Ca_v1.3$ est spécifique du tissu rythmogène, mais il est modérément exprimé dans les oreillettes. Distinctement de $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ est proche du RyR2 qui permet la sortie d'une charge importante de Ca^{2+} du RS dans les cellules *pacemaker* (Figure 25) (Christel, Cardona et al. 2012).

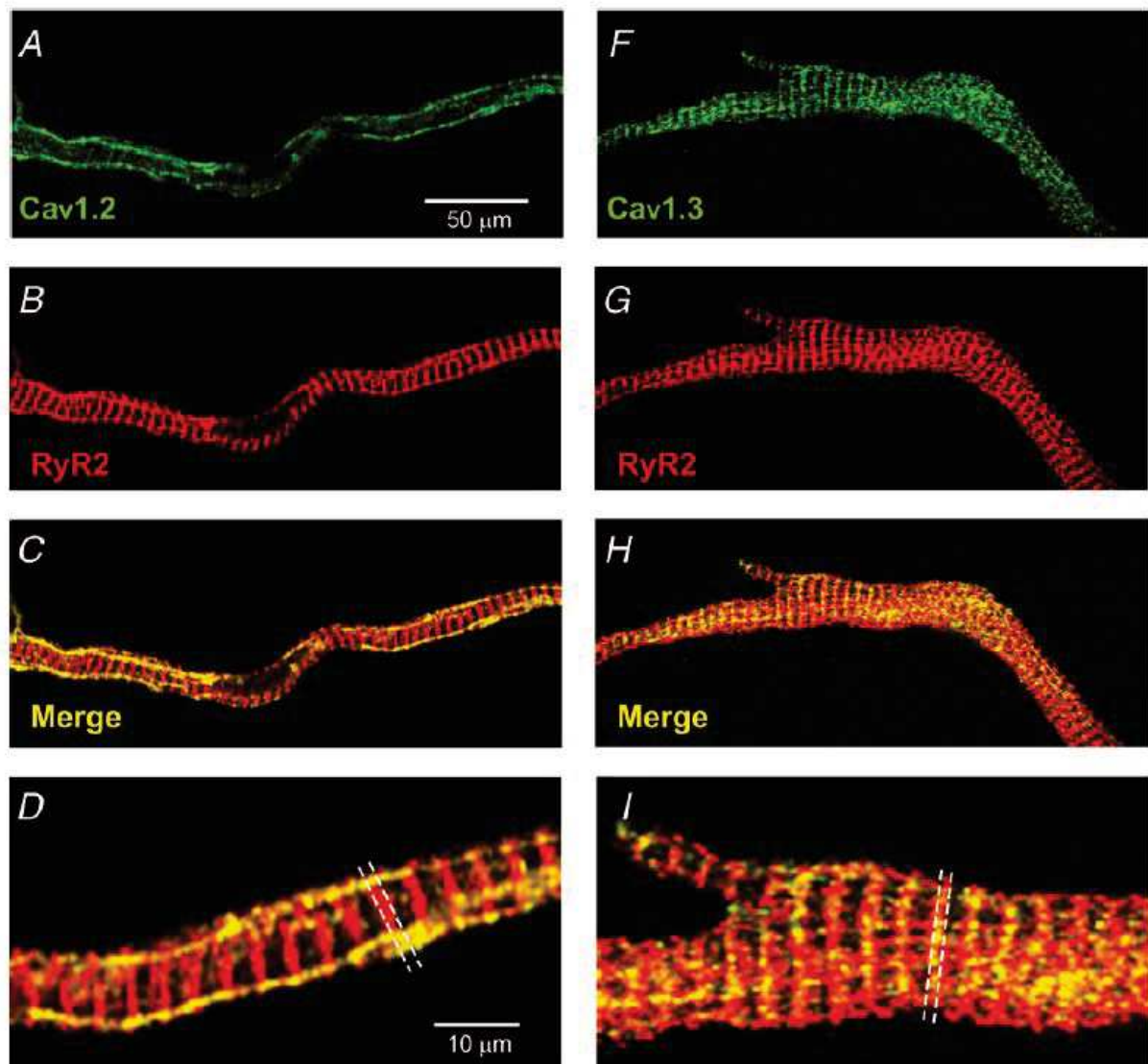


Figure 25 : Images du couplage entre $Ca_v1.3$ et RyR2 sur cNSA. Avec des anticorps anti- $Ca_v1.2$ (A, C, D) ou anti- $Ca_v1.3$ (F, H, I) additionné à un anti-RyR2 (B, G). Les bandes régulières du marquage de $Ca_v1.3$ (F) correspondent au motif marqué du RyR2 (G). D : $Ca_v1.2$ et RyR2 sont co-localisés au niveau de la membrane du sarcolemme. I : $Ca_v1.3$ et RyR2 sont co-localisés sur la membrane du sarcolemme et également sur les structures du sarcomère. Le ratio de co-immunofluorescence entre RyR2 et le LTCC montre une distribution proche entre $Ca_v1.3$ et RyR2 (données non montrées, voir l'article). D'après Christel, Cardona et al. 2012.

Propriétés des TTCC

Ca_v3.1 est le premier canal calcique activé dans la DD et a une cinétique d'inactivation rapide qui limite la conductance du Ca²⁺, plus petite que celle des LTCC (Mangoni, Couette et al. 2006). Son seuil d'activation est bas, autour de -60 mV avec un pic d'ouverture entre -40 mV et -30 mV. Il n'existe pas d'outil pharmacologique spécifique capable de discriminer les deux isoformes Ca_v3.1 et Ca_v3.2, mais Ca_v3.2 est plus sensible au blocage par le Ni²⁺ que Ca_v3.1 (Mangoni and Nargeot 2008).

Structure des TTCC

La structure des TTCC est sensiblement la même que les LTCC mise à part la présence d'une boucle appelée « *helix-loop-helix* » sur la chaîne liant le domaine I et II, à l'emplacement de la sous-unité β des LTCC. Cette boucle est une séquence correspondant au motif IQ du LTCC sensible à la CaM (Figure 26) (Chemin, Taiakina et al. 2017).

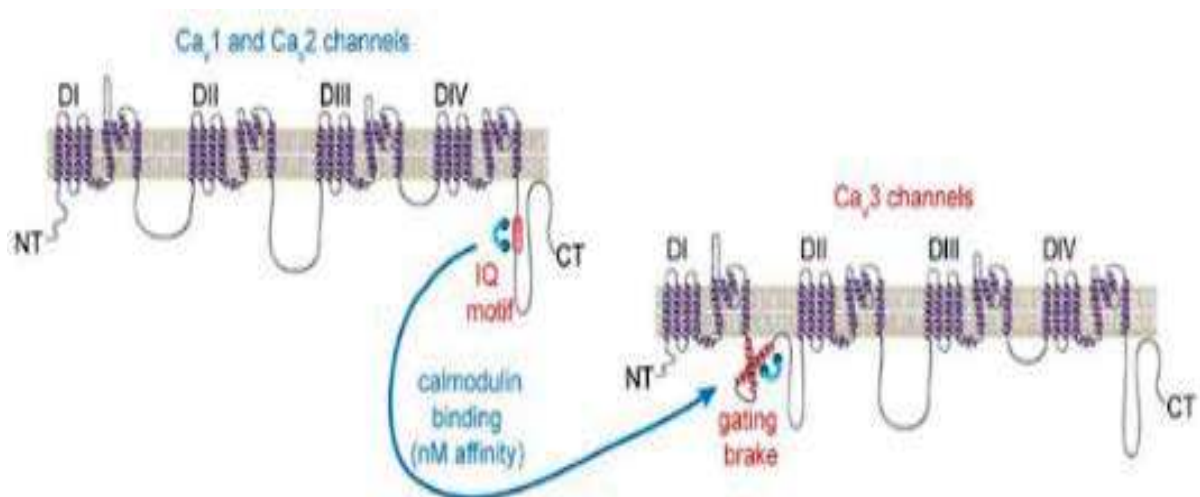


Figure 26 : Structure de TTCC. D'après Chemin et al. 2017

Expression des TTCC

Les TTCC existent sous 3 isoformes qui sont Ca_v3.1, Ca_v3.2 et Ca_v3.3. Cette dernière n'est pas exprimée dans le cœur (Monteil, Chemin et al. 2000) et ne sera donc pas discutée. Ca_v3.1 et

Ca_v3.2 sont exprimées dans le cœur des vertébrés mais à des stades différents, Ca_v3.2 est l'isoforme prédominante du stade embryonnaire dans le tissu cardiaque puis son expression décroît jusqu'à disparaître dans le cœur adulte (Cribbs, Martin et al. 2001, Ferron, Capuano et al. 2002). L'expression de Ca_v3.1 augmente pendant la phase périnatale et devient dominante chez l'adulte (Niwa, Yasui et al. 2004).

Globalement, Ca_v3.1 est exprimé dans les oreillettes, dont les centres rythmogènes (NSA, NAV) et dans le tissu conducteur (réseau de FP), il n'est pas exprimé dans les ventricules. Le courant I_{Ca,T} a été trouvé dans tous les tissus générant l'automatisme au niveau cardiaque ainsi que dans le sinus veineux d'amphibien, le myocarde embryonnaire de souris ou encore dans le cœur de poisson zèbre.

Modulation

La modulation des VDCC s'organise sur trois niveaux (Eden, Meder et al. 2016) :

- (1) La signalisation intracellulaire sensible aux neurotransmetteurs du SNA *via* la protéine kinase A (PKA) ;
- (2) la dépendance au voltage ;
- (3) la dépendance à la concentration en Ca²⁺ (notions d'inactivation et de facilitation pour ces deux derniers).

Le mécanisme d'inactivation dépendant du voltage est appelé « *inactivation voltage-dépendante* » (notée VDI pour *voltage-dependent inactivation*). Le mécanisme inverse est appelé VDF, F pour « *facilitation voltage-dépendante* » et booste l'entrée du Ca²⁺ (Dolphin 1996).

Le mécanisme dépendant de la concentration en calcium est appelé « *inactivation calcium-dépendante* » (notée CDI pour *calcium-dependent inactivation*) et à l'inverse, le CDF pour « *facilitation calcium-dépendante* ».

Protéines de phosphorylation

- **Phosphorylation des LTCC**

Les LTCC sont régulés par la voie sympathique, incluant l'AMPc activant la PKA, qui phosphorylent les LTCC à différents sites sur la région C-terminale. Avec 75 % d'homologie de leurs séquences, les LTCC $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ se différencient par leurs sites de phosphorylation (Zuccotti, Clementi et al. 2011). L'activité de la PKA est facilitée par des AKAPs pour « A-kinase anchoring proteins ».

Par opposition à la voie adrénergique, la régulation muscarinique par l'ACh et la protéine G α_o diminue l'ouverture des LTCC *via* une réduction d'AMPc et de l'activité de la PKA (Valenzuela, Han et al. 1997). En parallèle, la synthèse d'oxyde nitrique (NO) est stimulée et favorise la phosphodiesterase (PDEII) qui crée une élévation en GMPc, provoquant une dépression de l'AMPc (Han, Shimoni et al. 1995, Shimoni, Han et al. 1996), (Han, Kobzik et al. 1998).

○ **Phosphorylation des TTCC**

La régulation des TTCC reste discutée car les voies de régulation varient en fonction des conditions et du type cellulaire et des sous-unités α qui différencient les isoformes Ca_v3 . $Ca_v3.1$ serait bien sensible à la PKA comme les LTCC (Chemin, Traboulsie et al. 2006, Li, Wang et al. 2012). Les TTCC seraient inhibés par la PKC et stimulés par des tyrosines kinases et CAMKII, sauf $Ca_v3.1$ ce qui suggère que les sites de phosphorylation se situent sur la sous-unité α du canal (Perez-Reyes 2003).

Récemment en 2017, Y. Li et collaborateurs ont montré chez la souris que la perte de $Ca_v3.1$ réduit la réponse β -adrénergique de la cellule *pacemaker* et du NAV et que la surexpression l'augmente (Li, Zhang et al. 2017).

Sensibilité au voltage

○ **VDF et VDI des LTCC**

L'origine de la sensibilité au voltage des LTCC vient du changement de conformation du canal basé sur le mécanisme du « *hinged-lid* », traduit littéralement par « couvercle rabattable ». La boucle entre le domaine I et II (ED motif, Figure 24) change de conformation et bouche le pore du canal. $Ca_v1.3$ aurait un motif particulier de 10 acides aminés chargés négativement contre 7

pour $Ca_v1.2$, lui conférant ainsi une cinétique d'inactivation moins rapide que $Ca_v1.2$ (Tadross, Ben Johny et al. 2010).

D'autres éléments montrent la singularité de l'activation de $Ca_v1.3$ (Zuccotti, Clementi et al. 2011), comme l'épissage alternatif de l'exon 9 localisé dans la boucle. Des mutations sur cet exon provoquent un déplacement du seuil d'activation du canal vers l'hyperpolarisation de -9 à -11 mV. Classiquement, le déplacement du seuil d'activation réduit la probabilité d'ouverture du canal et donc le courant.

L'intensité de la VDI et de la VDF est différente entre $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$. L'inactivation par le voltage de $Ca_v1.2$ est plus forte que $Ca_v1.3$, l'inverse pour la facilitation (Christel and Lee 2012, Christel, Cardona et al. 2012). La protéine Erbin augmente le nombre de canaux $Ca_v1.3$ ouverts lors de la facilitation et son interaction s'effectue dans la partie C-terminale du canal. Cette protéine a un effet négatif sur l'auto-inhibition et renforce la VDF de $Ca_v1.3$. Selon des modèles numériques, la VDF serait responsable de 25 % de la régulation du courant de type L *via* $Ca_v1.3$ et aurait donc une importance capitale dans la régulation de l'automatisme. D'autres protéines interagissent avec $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ tel que SHANK, NIL-16, CIPP et STIM1 dans d'autres types cellulaires (Zuccotti, Clementi et al. 2011).

○ **VDF et VDI des TTCC**

Les TTCC sont des VDCC activés à un seuil de voltage très négatif et leurs cinétiques d'activation et d'inactivation en sont fortement dépendantes. La facilitation de la Voltage-dépendance des TTCC a été démontré dans plusieurs études (Ganitkevich and Isenberg 1991) Pour $Ca_v3.1$, cette dépendance au voltage est altérée lorsque les domaines I, III et IV d' α_1 sont mutés. La modulation de l'inactivation des TTCC est une caractéristique très distinctive car elle dépend de la cinétique de l'activation de ces mêmes canaux. C'est le segment S6 du domaine III formant la paroi du pore sur la face intracellulaire qui est impliqué dans l'activation et l'inactivation du canal $Ca_v3.1$ (Talavera and Nilius 2006). L'inactivation voltage-dépendante du courant calcique de type T est rapide en comparaison des autres courants calciques. La stimulation et l'inhibition de l'activité des TTCC se feraient à travers des protéines G_q ou G_i/G_o (Alvarez, Rubio et al. 1996).

Dépendance au Ca²⁺

○ CDF et CDI des LTCC

Le CDI est fortement lié à l'interaction de la CaM associé au domaine IQ (isoleucine-glutamine) de la partie C-terminale du canal (Figure 24). La CaM a un rôle de senseur du Ca²⁺ et son association avec la partie C-terminale ferme le canal de l'intérieur.

Des mutations sur la partie C-terminale de Ca_v1.3 induisent une cinétique différente et ont pour conséquence une activation à un seuil plus bas. La Calmoduline-dependent kinase II (CaMKII) se lie et phosphoryle la CaM sur la partie C-terminale des LTCC et augmente leur probabilité d'ouverture. Ca_v1.2 a une liaison directe, alors que la CDF de Ca_v1.3 inclut d'autres protéines dites d' « échafaudage » telles que Densin ou Erbin qui se lient au domaine PDZ et permettent la liaison de la CaMKII (Christel and Lee 2012).

○ CDI et CDF des TTCC

Les TTCC sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie calcique (Chemin, Monteil et al. 2000). Une étude récente a montré que les TTCC Ca_v3.1 et Ca_v3.3 sont sensibles au Ca²⁺, alors que Ca_v3.2 ne l'est pas (Publicover, Preston et al. 1995, Cazade, Bidaud et al. 2017). En effet l'augmentation de Ca²⁺ sous-membranaire induit une importante diminution de l'amplitude du courant de ces types T à cause d'une hyperpolarisation du seuil d'inactivation. Cav3.1 est sensible à la CaM *via* la séquence « *helix-loop-helix* » entre le domaine I-II (Figure 26) (Chemin, Taiakina et al. 2017). Les résidus sensibles à la CaMKII des TTCC ne sont pas présents sur l'isoforme Ca_v3.1 la rendant insensible (Christel and Lee 2012).

J. Chemin et collaborateurs en 2014 ont détaillé la sensibilité des TTCC à certains lipides endogènes tels que l'acide arachidonique (AA) qui les inhibent. L'AA joue un rôle important dans le processus d'inflammation et de régulation vasculaire (c'est un précurseur des prostaglandines, des leucotriènes et des acides epoxyeicosatriénoïque (EETs)). Une concentration de l'ordre de quelques micromolaires d'AA accélère la cinétique d'inactivation des TTCC et déplace le seuil d'ouverture à un seuil plus bas vers -80 mV (Chemin, Cazade et al. 2014).

III.3.2 Dysfonction génétique chez l'homme

Les dysfonctionnements ou la perte des LTCC et/ou TTCC sont la cause de pathologies du NSA chez l'humain. Un premier cas de figure montre que le dysfonctionnement de $Ca_v1.3$ provoque une bradycardie et des problèmes de surdité chez l'homme connus sous le nom de syndrome SANDD (« *sinoatrial node dysfunction and deafness* ») (Baig, Koschak et al. 2011).

En effet, $Ca_v1.3$ est impliqué dans la libération du glutamate au niveau des synapses dans l'oreille interne mais ce sont les répercussions dans le *pacemaker* qui nous intéressent. La publication de S.M. Baig et collaborateurs en 2011 montre que la perte de fonction de $Ca_v1.3$ est congénitale (mutation homozygote et hétérozygote CACNA1D) et provoque une bradycardie (entre 40 et 60 bpm) accompagnée d'une augmentation de la variabilité du rythme cardiaque (Figure 27). Egalement, des phénomènes d'AVB de second et de troisième degrés chez plusieurs membres de la même famille ont été rapportés. La faible fréquence cardiaque pourrait avoir comme origine le NAV ou les branches du faisceau de His en cas de pause du NSA.

L'étude rapporte aussi que les individus atteints présentaient de sévères syncopes pendant l'enfance en cas d'activité physique ou de stress et chez certains individus en condition d'activité physique normale. La mutation intervient sur l'exon 8B (Figure 24) d'un segment S6 contenu dans le domaine I du pore du canal créant ainsi un défaut de conductance du Ca^{2+} .

Un autre cas de dysfonction concerne les blocs cardiaques congénitaux (CHB pour « *Congenital heart block* ») qui représentent une maladie autoimmune provenant de la mère qui affecte leurs enfants. Cette pathologie est caractérisée par des AVBs du cœur fœtal et les autopsies des jeunes patients révèlent une myocardite et une fibrose au niveau du NAV (Figure 28). Le taux de mortalité des nourissons CHB est d'environ 30 % et 60 % et les enfants qui survivent seront équipés de *pacemaker* électronique une fois adulte.

En 2001, G.Q. Xiao et collaborateurs montrent l'interaction directe d'IgG sur les LTCC et les TTCC dans la pathogénèse des CHB chez la souris (Xiao, Hu et al. 2001). Dans cette étude, l'injection d'IgG chez la souris gestante provoque des AVBs et une bradycardie sinusale de la descendance. La perfusion d'IgG sur des oocytes de xenope montre une inhibition d' I_{CaL} et

d'I_{CaT}. Précédemment dans le même laboratoire, l'effet arythmogénique des IgG maternelles sur le cœur isolé en Langendorff et sur les cardiomyocytes isolés a également été montré.

En 2005, ce laboratoire confirme que Ca_v1.3 est bien exprimé dans le cœur fœtal et qu'il est directement inhibé par les IgG (Qu, Baroudi et al. 2005).

En 2013, L. Strandberg et collaborateurs. montrent le ciblage de ces anticorps sur l'épitope extracellulaire de Ca_v3.1 en *patch clamp* sur des cNSAs de souris (Strandberg, Cui et al. 2013).

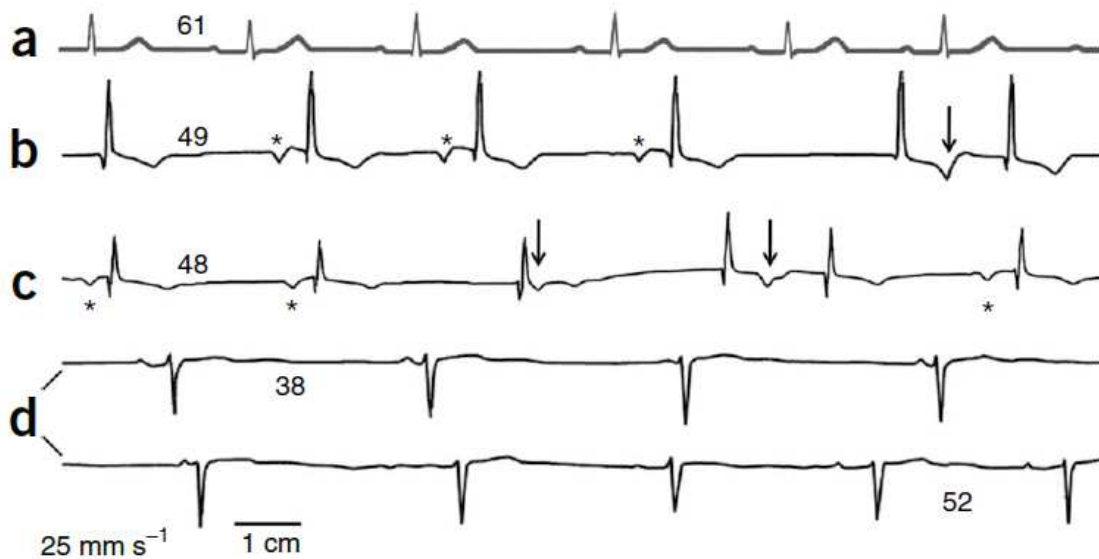


Figure 27 : Enregistrements ECG de patients atteints de syndrome SANDD. En comparaison d'une personne saine (a), les ECG de trois individus portant la mutation homozygote CACNA1D montrent des anomalies. Les astérisques marquent les ondes P précédant les complexes QRS, les flèches désignent des ondes P coïncidant avec des ondes T. Chez les patients malades, les intervalles P-P et R-R sont variables soulignant une arythmie sinusale. Les numéros indiquent le rythme cardiaque calculé à partir de l'intervalle R-R. D'après SM Baig et al., 2011.

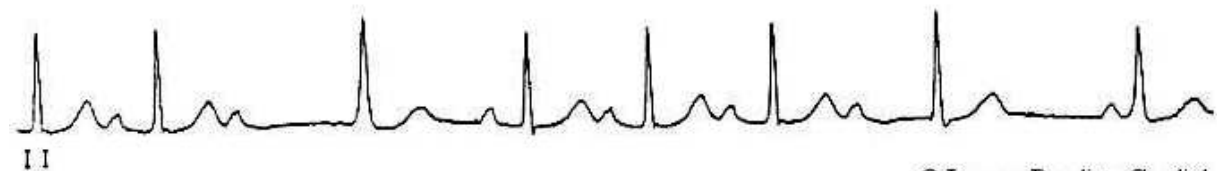


Figure 28 : ECG descriptif d'un AVB II avec une prolongation progressive de l'intervalle P-R (Mobitz type II) d'un patient CHB. De Friedman et al. 2003, Images in paediatric cardiology.

III.3.3 Souris génétiquement modifiées pour les VDCC

Au début des années 2000, les avancées dans le domaine de la génétique ont influencé la recherche grâce au développement de modèles animaux génétiquement modifiés. Concernant les canaux d'intérêt $Ca_v3.1$ et $Ca_v1.3$, la création de modèles de souris génétiquement modifiées pour ces canaux a permis de comprendre les pathologies et de développer des nouvelles thérapies. Ces organismes génétiquement modifiés sont devenus essentiels pour l'étude du rôle fonctionnel de ces canaux et de leurs interactions avec les autres composants du mécanisme fondamental du *pacemaker*. Ils mettent en évidence la fonction d'un gène codant pour un canal ionique et son altération.

Souris *knockout* $Ca_v1.3^{-/-}$

En 2000, l'équipe dirigée par Jörg Striessnig génère une souris mutante $Ca_v1.3^{-/-}$ et la caractérise pour l'étude des SANDD. L'étude des ECGs enregistrés chez ces souris mutantes révèle une bradycardie et des arythmies sinusales (Platzer, Engel et al. 2000) (Figure 29).

Au même moment, en Californie, Z. Zhang et collaborateurs génèrent d'autres souris $Ca_v1.3^{-/-}$ similaires, et observent les mêmes dysfonctions *in vivo* (Zhang, Xu et al. 2002) qu'ils suggèrent être dues à une activité anormale du NSA. Dans ce sens, l'exploration fonctionnelle avec une microélectrode *ex vivo* du NSA isolé à partir de souris $Ca_v1.3^{-/-}$ est réalisée et montre une diminution de l'activité intrinsèque. Les paramètres associés à l'activité *pacemaker* du NSA sont mesurés (Figure 30).

- En lien avec l'absence de $Ca_v1.3$, la pente de la phase de dépolarisation diastolique exponentielle (EDD) est réduite dans la fenêtre d'activation du canal, ce qui induit un ralentissement de la fréquence des PAs (le temps entre deux PAs est augmenté (CL)) (Figure 30 B).
- la durée des PAs (notée APD pour « *action potential duration* ») est modifiée en comparaison de la souris *WT*. Jusqu'à 50 % de la repolarisation, elle est réduite, alors qu'elle est augmentée en mesurant la durée jusqu'à 80 % de la repolarisation. Ceci est probablement dû à un dérèglement de l'homéostasie calcique qui pourrait altérer l'inactivation de $Ca_v1.2$ (VDI et CDI).

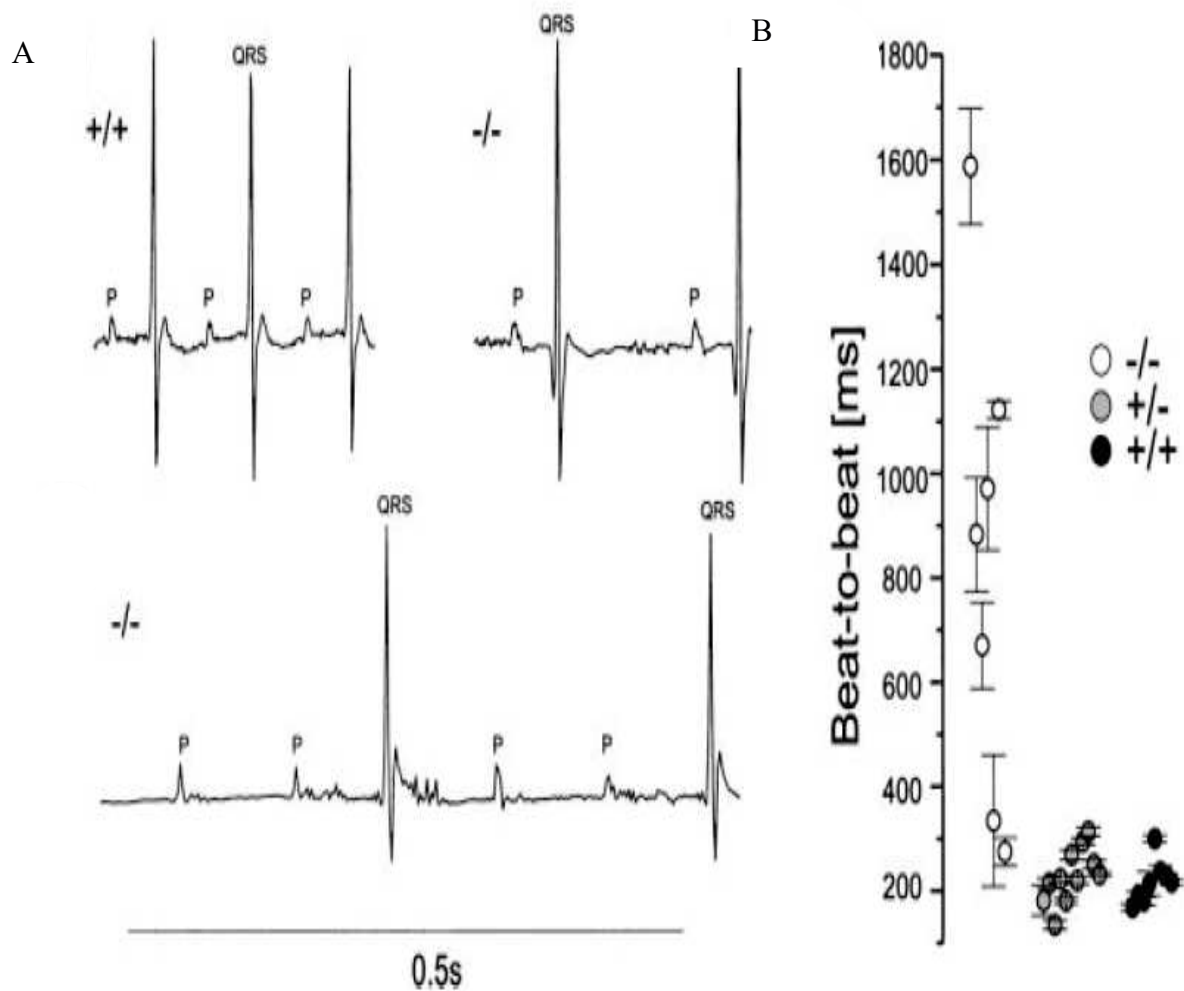


Figure 29 : Activité cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. (A) : les ECGs enregistrés chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présentent une bradycardie du NSA et des AVBs caractérisés par un intervalle RR (« beat-to-beat » illustré en (B)) plus long et plus variable que chez les WT et le génotype hétérozygote. D'après Platzer et al. 2000.

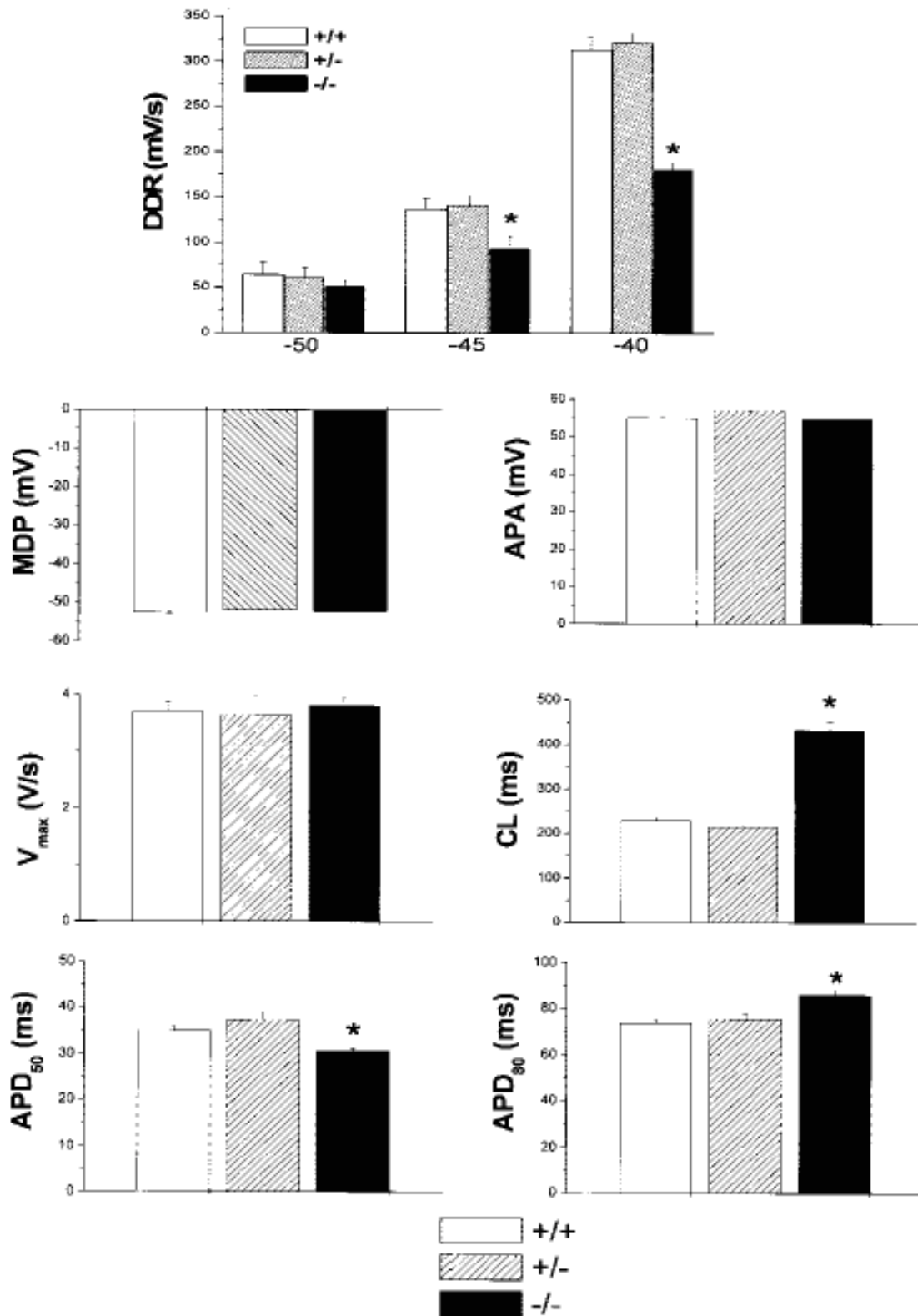


Figure 30 : Paramètres mesurés avec une microélectrode sur le NSA entier de souris WT, hétérozygote $Ca_v1.3^{+/-}$ et homozygote négatif $Ca_v1.3^{-/-}$. DDR : Diastolic depolarization rate ; CL : Cycle length ; MDP : Maximum diastolic potential ; APA : AP amplitude ; V_{max} : Maximum upstroke velocity ; APD : AP duration à 50 ou 80 % de la repolarisation. D'après Zhang, Xu et al. 2002.

Quel est le rôle de $Ca_v1.2$ dans le pacemaker lorsque $Ca_v1.3$ est inactivé?

La technique de *patch clamp* sur des cNSAs isolées a permis d'étudier les mécanismes de génération de l'activité *pacemaker* et de définir les propriétés biophysiques différentielles de $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$.

Z. Zhang et collaborateurs observent que la perte de $Ca_v1.3$ déplace l'activation de +5 mV et réduit la courbe d'inactivation d' I_{CaL} sans changer la conductance. Ils suggèrent une possible compensation de la régulation de $Ca_v1.2$ dans les cNSAs de $Ca_v1.3^{-/-}$ en montrant que la surexpression de $Ca_v1.2$ ou $Ca_v1.3$ dans des HEK293 laisse apparaître le même écart de +5 mV entre la courbe d'activation de $Ca_v1.2$ par rapport à celle de $Ca_v1.3$.

L'expérimentation en *patch clamp* sur les cNSAs est également privilégiée par notre équipe en 2003 pour déterminer le rôle de $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ dans l'activité *pacemaker* (Mangoni, Couette et al. 2003). Les enregistrements effectués montrent que la délétion de $Ca_v1.3$ ne ralentit pas seulement l'activité *pacemaker*, mais qu'elle favorise également un profil spontanément arythmique (Figure 31).

Les ARNm de $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ ont été identifiés dans le tissu sinusal par RT-PCR. Les courbes d'activation d' I_{CaL} et des tests pharmacologiques avec une DHP (Isradipine, ISR 0.2 μ M) et du BayK 8644 (BayK, 1 μ M) montrent que $Ca_v1.3$ est activé pendant la DD des cNSAs, 10 mV après l'activation d' I_{CaT} ($Ca_v3.1$). Chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}$, I_{CaL} a un seuil d'activation plus positif et une inactivation sensible au voltage, correspondant aux paramètres électrophysiologiques de $Ca_v1.2$. Ceci révèle que $Ca_v1.2$ contribue à la phase de dépolarisation systolique du PA et pas à la DD.

L'étude de l'activité *pacemaker* chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a permis de confirmer que $Ca_v1.3$ est un canal spécifique du *pacemaker* au niveau cardiaque au même titre qu' I_f , et que $Ca_v1.2$ est un contributeur du PA non spécifique du *pacemaker*. $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ sont deux isoformes très proches et sensibles aux DHPs, avec toutefois deux fonctions totalement distinctes au sein de la cellule cardiaque.

Pour étudier les deux isoformes de LTCC, un autre modèle de souris génétiquement modifiée, nommée $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$, a été créée. La mutation T1066Y sur la sous-unité $\alpha 1$ se caractérise par

une insensibilité de $Ca_v1.2$ aux DHPs ainsi qu'un changement de modulation par le BayK, tout en gardant sa fonction et son expression basale.

Ce génotype permet d'inhiber uniquement $Ca_v1.3$ en présence de DHP (Sinnegger-Brauns, Hetzenauer et al. 2004). *Ex vivo* sur le système Langendorff, la perfusion de DHP a un effet bradycardisant sur le cœur isolé $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ prouvant une fois de plus l'implication de $Ca_v1.3$ dans le contrôle de la DD. De plus, le cœur des souris $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ ne subit pas l'effet inotrope négatif de la perfusion de DHP (ISR 1 μ M) et les muscles lisses aortiques ne se relaxent pas contrairement aux cœurs *WT*.

L'étude en 2011 de L. Marger dans notre groupe (Marger, Mesirca et al. 2011) montre que $Ca_v1.3$ est également requis pour le *pacemaker* dans le NAV et constitue l'isoforme de LTCC prédominant. Chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}$, certaines cellules *pacemaker* du NAV (cNAVs) ne génèrent pas d'activité *pacemaker* de manière spontanée, le potentiel de membrane diastolique stagne autour de -32 ± 4 mV (Figure 32 A) avec une faible oscillation d'amplitude, tout comme les cNAVs *WT* sous perfusion de DHP.

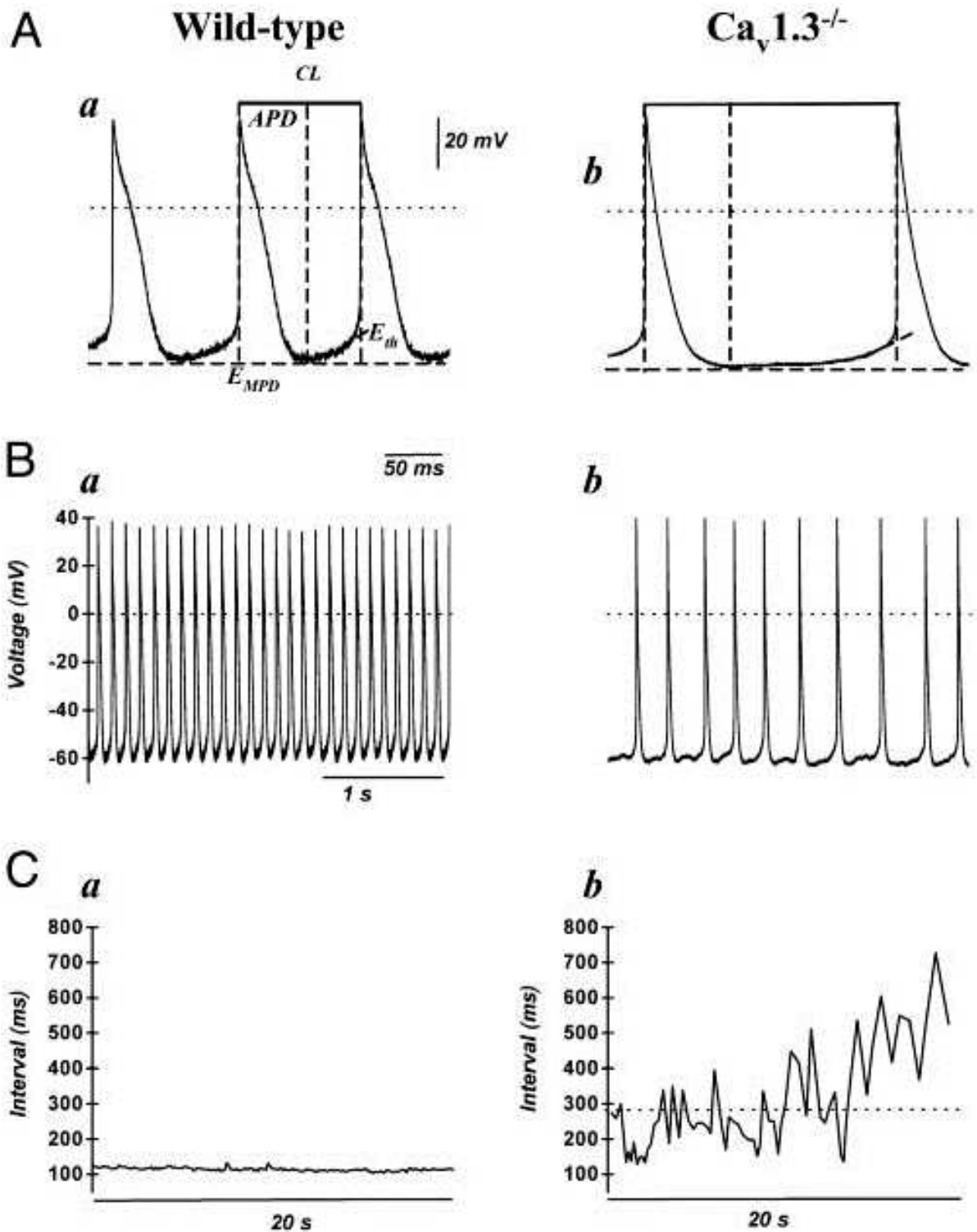


Figure 31 : Profil électrophysiologique des cNSA de souris $Ca_v1.3^{-/-}$. A : Enregistrements de PAs de cNSA chez WT et $Ca_v1.3^{-/-}$. B&C : Le rythme de l'activité cellulaire est irrégulier à cause de la perte de $Ca_v1.3$ (b) en comparaison avec WT (a). D'après Mangoni et al. 2003.

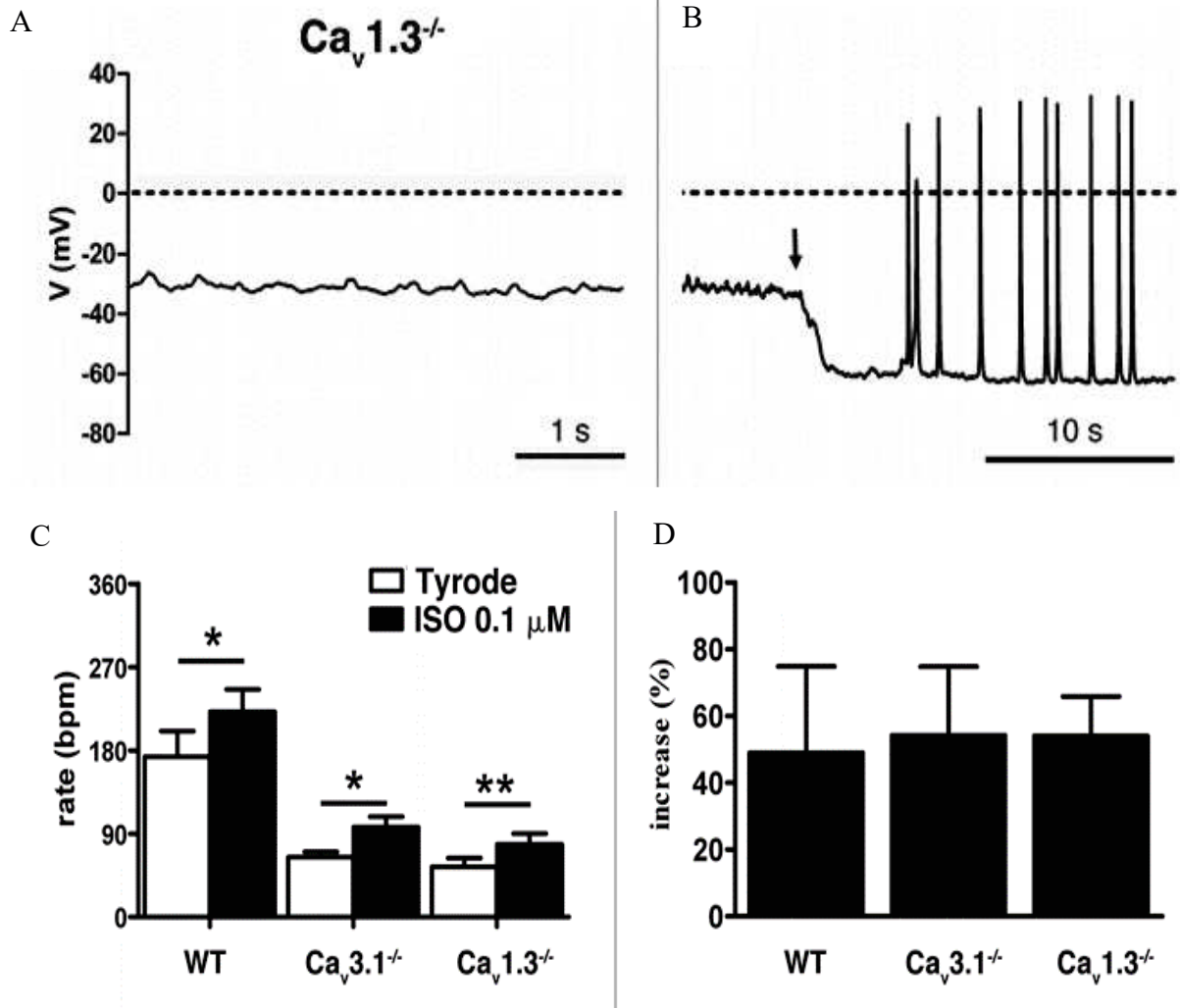


Figure 32 : Activité pacemaker de cNSA de $Ca_v1.3^{-/-}$ et paramètres mesurés en patch clamp. Potentiel de membrane type de cNAV de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ en condition basale (A) et sous l'injection d'un courant négatif à partir de la flèche (B) qui déclenche des PAs. C : Fréquence de PA en condition contrôlée (barres blanches) et sous ISO 0.1 μ M (barres noires) des trois génotypes WT, $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v3.1^{-/-}$. D : Effet relatif de l'ISO 0.1 μ M en pourcentage de la fréquence de PA. D'après Marger et al., 2011

Pourquoi des cNAVs de $Ca_v1.3^{-/-}$ ne génèrent plus d'activité spontanée ?

L'élévation du potentiel observée par L. Marger (Figure 32 A) dans les cNAVs pourrait être due aux courants potassiques repolarisants en balance avec I_{CaL} . En effet, L. Marger et collaborateurs ont observé que l'injection d'un courant négatif hyperpolarisant déclenche des PAs vers un potentiel de -60 mV dans 64 % des cNAVs tandis que 36 % restent silencieuses. Cette observation permet de désigner $Ca_v1.3$ comme un « initiateur du *pacemaker* » dans les cNAVs. D'autre part, l'injection de courant dans les cNAVs de $Ca_v1.3^{-/-}$ ne restaure pas un potentiel normal (pas de pente de DD), ni des PAs d'amplitude comparable à ceux de la souris *WT*, suggérant ainsi la contribution de $Ca_v1.3$ dans le PA lui-même (Figure 32 B).

La régulation de l'activité *pacemaker* par la voie β -adrénergique est également abordée dans cette étude. Sans $Ca_v1.3$ et toujours en présence de courant négatif, la stimulation à l'ISO (0.1 μ M) ne permet pas de restaurer une fréquence de PA égale à celle des *WT* dans la même condition. En revanche, l'effet relatif est le même en termes de pourcentage d'augmentation (Figure 32 D).

Jusqu'à ce jour, l'étude du modèle murin $Ca_v1.3^{-/-}$ par différents groupes a permis de montrer que la mutation entraînant la perte de l'expression de $Ca_v1.3$ (*KO*) ne porte pas atteinte à la contractilité myocardique, ni à la structure cardiaque (Matthes, Yildirim et al. 2004) et que la stimulation de l'oreillette induit des phénomènes de FA et de flutter (Zhang, He et al. 2005).

Souris Knockout Ca_v3.1^{-/-}

L'étude du rôle fonctionnel de Ca_v3.1 a elle aussi nécessité la création d'un modèle de souris génétiquement modifiée.

En 2001, les coréens D. Kim et collaborateurs génèrent au sein de leur laboratoire un KO Ca_v3.1^{-/-} pour étudier l'implication de ce TTCC dans des phénomènes de SWD (« *Spike-and-wave discharges* ») au niveau des neurones cortico-thalamiques (Kim, Song et al. 2001).

En 2004, notre équipe montre pour la première fois l'implication de Ca_v3.1 dans l'activité *pacemaker* et la conduction cardiaque en caractérisant la souris Ca_v3.1^{-/-} *in vivo* et en étudiant les propriétés électrophysiologiques des cNSAs isolées *in vitro*. Dans ce modèle Ca_v3.1^{-/-}, les souris présentent une faible bradycardie inférieure à 10 % du rythme normal et un ralentissement de la conduction atrioventriculaire caractérisé par un allongement de 9 % de l'intervalle PQ sur les ECG (sur souris anesthésiées dont le SNA a été inhibé par des injections combinées d'atropine et de propranolol, Figure 33 A et B).

Contrairement à ce qui est observé chez la souris Ca_v1.3^{-/-}, le rythme cardiaque est régulier chez ces souris mutantes Ca_v3.1^{-/-}. Les effets de la délétion sont visiblement plus marqués sur l'activité des cNSAs isolées présentant une fréquence de PA diminuée de 37 % et une pente de la DD de 44 % (Figure 33 E). Cette différence dans l'impact de la mutation sur l'activité du cœur *in vivo* et l'activité *pacemaker* observée *in vitro* pourrait être due à une compensation du tonus adrénergique *in vivo*, sur les effecteurs I_{CaL}, I_f et la libération diastolique de Ca²⁺ dépendant du RyR.

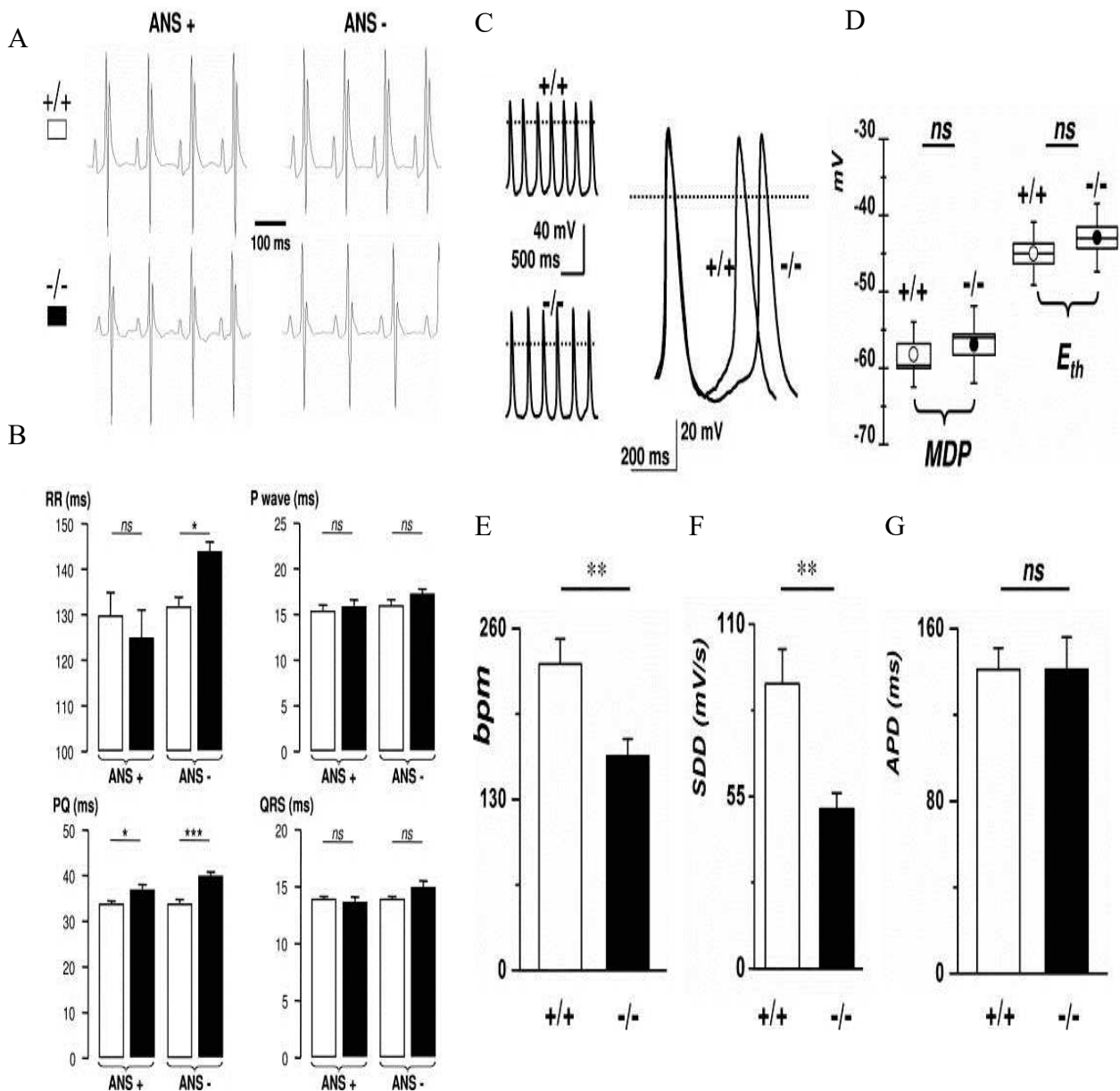


Figure 33 : Ensemble des caractéristiques de l'activité cardiaque de la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ in vivo et in vitro sur cNSA isolée. (A et B) Les ECG in vivo montrent une légère bradycardie (intervalle RR allongé) chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ lorsque l'influence du SNA est supprimée en condition ANS- (traitement atropine + propranolol). La délétion de $Ca_v3.1$ induit également un ralentissement de la conduction AV (intervalle PQ allongé). La durée de l'onde P et du complexe QRS reste inchangée. (C) In vitro, l'enregistrement de PAs sur cNSA montre une diminution de la pente de la DD et une diminution de la fréquence de PA à cause de la perte de $Ca_v3.1$ (E et F). La durée des PAs, le potentiel maximum de dépolarisation et le seuil de déclenchement de PA ne sont pas modifiés (G et D). D'après Mangoni et al. 2006

D'après les enregistrements en *patch clamp* où la totalité du courant I_{CaT} a été supprimé, la perte de $Ca_v3.1$ n'a pas d'effet sur I_{CaL} qui maintient l'amplitude d' I_{Ca} dans la DD (Figure 34). Les deux courants calciques I_{CaL} et I_{CaT} ont donc un rôle différent dans le mécanisme *pacemaker*.

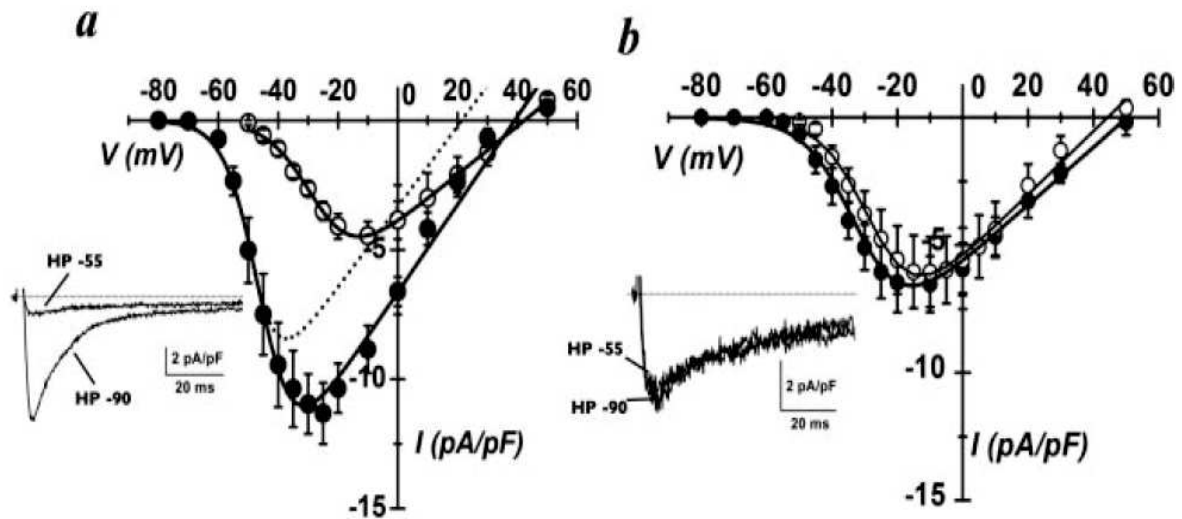


Figure 34 : I_{Ca} dans les cNSA des souris WT (a) et $Ca_v3.1^{-/-}$ (b). La totalité d' I_{Ca} est enregistrée à un potentiel de -90 mV (marques rondes noires) et I_{CaL} à un potentiel de -55 mV. Chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$, le courant total I_{Ca} correspond à I_{CaL} . D'après Mangoni et al. 2006.

Comme pour $Ca_v1.3$, les travaux de L. Marger dans notre groupe en 2011 rapportent l'importance de $Ca_v3.1$ dans l'activité *pacemaker* du NAV au niveau cellulaire. Contrairement à ce qui a été observé dans les cNAVs isolées de souris $Ca_v1.3^{-/-}$, l'activité *pacemaker* des cNAVs n'est pas stoppée par la perte de $Ca_v3.1$. Elle montre toutefois une diminution de la fréquence de 70 % et une irrégularité dans la fréquence de décharge des PAs par rapport aux WT. Comme pour la souris $Ca_v1.3^{-/-}$, l'ISO ne permet pas de récupérer une fréquence maximale de PA, similaire à celle obtenue chez la souris WT. L'ISO ne rétablit pas une fréquence stable non plus. Par contre, l'effet relatif en pourcentage est similaire (Figure 32 (d)).

L'enregistrement d' I_{Ca} dans les cNSAs de $Ca_v3.1^{-/-}$ montre des propriétés similaires à celles d' I_{CaL} (Figure 34 b), il n'y a donc pas de modification de l'activité des LTCC sans $Ca_v3.1$.

La perte de $Ca_v3.1$ cause un dysfonctionnement dans l'excitabilité du NAV. Le temps de conduction du signal passant exclusivement par cette structure (NSA → His) est allongé ainsi

que la période réfractaire au niveau atrioventriculaire. Le temps de conduction du signal ne passant pas par le NAV (His → ventricule) reste inchangé (Figure 35).

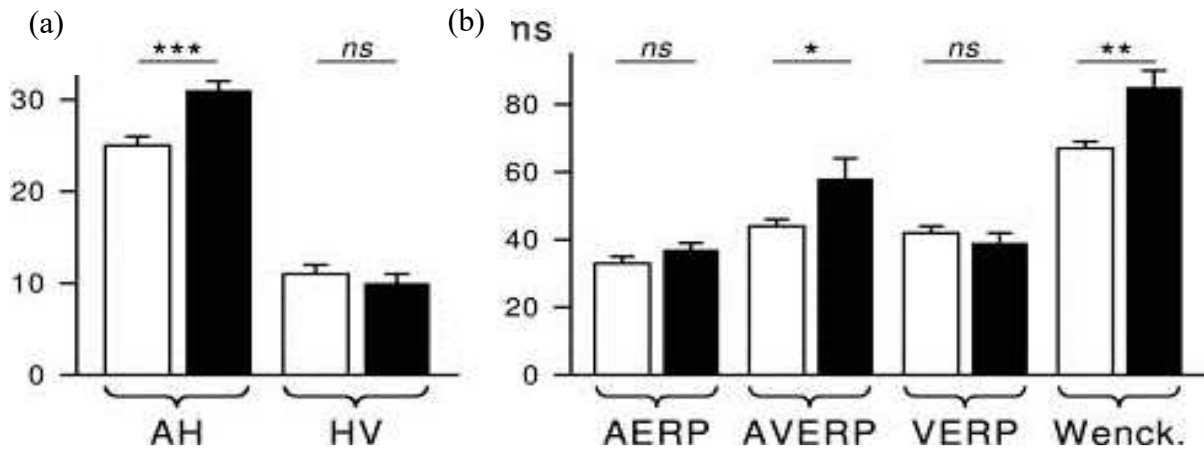


Figure 35 : Temps de conduction mesurés *in vivo* chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$. (a) Intervalles de temps mesurés entre la contraction des oreillettes et His (AH) et de His à la contraction des ventricules (HV) sur les ECGs *in vivo* chez la souris WT (barres blanches) et $Ca_v3.1^{-/-}$ (barres noires). (b) Périodes réfractaires effectives (ERP) des oreillettes (AERP), de la partie atrioventriculaire (AVERP), des ventricules (VERP) et longueur de cycle Wenckebach (Wenck) symbolisant des AVBs. D'après Mangoni et al. 2006.

L'activité électrique cardiaque des souris $Ca_v3.1^{-/-}$ a été étudiée au niveau du ventricule où la mutation semble quand même avoir un impact conséquent. D'après K. Le Quang et collaborateurs en 2013 (Le Quang, Benito et al. 2013), elles présentent des rythmes d'échappement et une bradycardie qui conduit à des AVBs et une tachyarythmie ventriculaire. Après les AVBs, les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ montrent un rythme d'échappement plus lent et une probabilité plus importante de torsade de pointe ainsi qu'un plus fort taux de mortalité que des souris sauvages.

Lignée KO $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$:

D'après les études décrites précédemment dans ce chapitre, le NAV et le NSA sont les acteurs majeurs de la conduction et de l'automatisme et les souris modèles apportent un bon nombre d'informations sur les rôles fonctionnels des canaux ioniques impliqués.

Dans le but d'approfondir encore la compréhension du mécanisme *pacemaker* atrioventriculaire, l'équipe de Matteo Mangoni a généré des croisements inter-génotypes entre la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ et la souris $Ca_v1.3^{-/-}$. La souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n'exprime plus de canaux calciques VDCC générant I_{Ca} impliqué dans la DD.

Ce dernier génotype a été caractérisé au niveau du NAV et des cNAV's en 2011 par L. Marger en comparaison avec les génotypes simples KO (Marger, Mesirca et al. 2011). Les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ présentent un retard plus sévère dans la conduction atrioventriculaire, un intervalle PR plus long et un nombre exacerbé de phénomène d'ondes P isolées que les génotypes mutants simples KO, traduisant un effet additif de la perte des deux VDCC (Figure 36).

Au niveau des cNAV's en *patch clamp*, la fréquence des PAs des cNAV's de $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ est réduite de 86 % par rapport au *WT*. Les mêmes phénomènes de quiescence de l'activité (absence de PAs spontanés) et de récupération d'une activité spontanée grâce à l'injection de courant négatif rapportés dans les cNAV's de $Ca_v1.3^{-/-}$ sont observés (Figure 37). Ce courant ne permet pas de restituer une activité normale, la fréquence des PAs est inférieure à celle de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ dans la même condition (et celle de la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ en condition basale). Cette différence entre génotypes simple et double mutants met en évidence la contribution de $Ca_v3.1$ lors de l'injection de courant dans les cNAV's de $Ca_v1.3^{-/-}$.

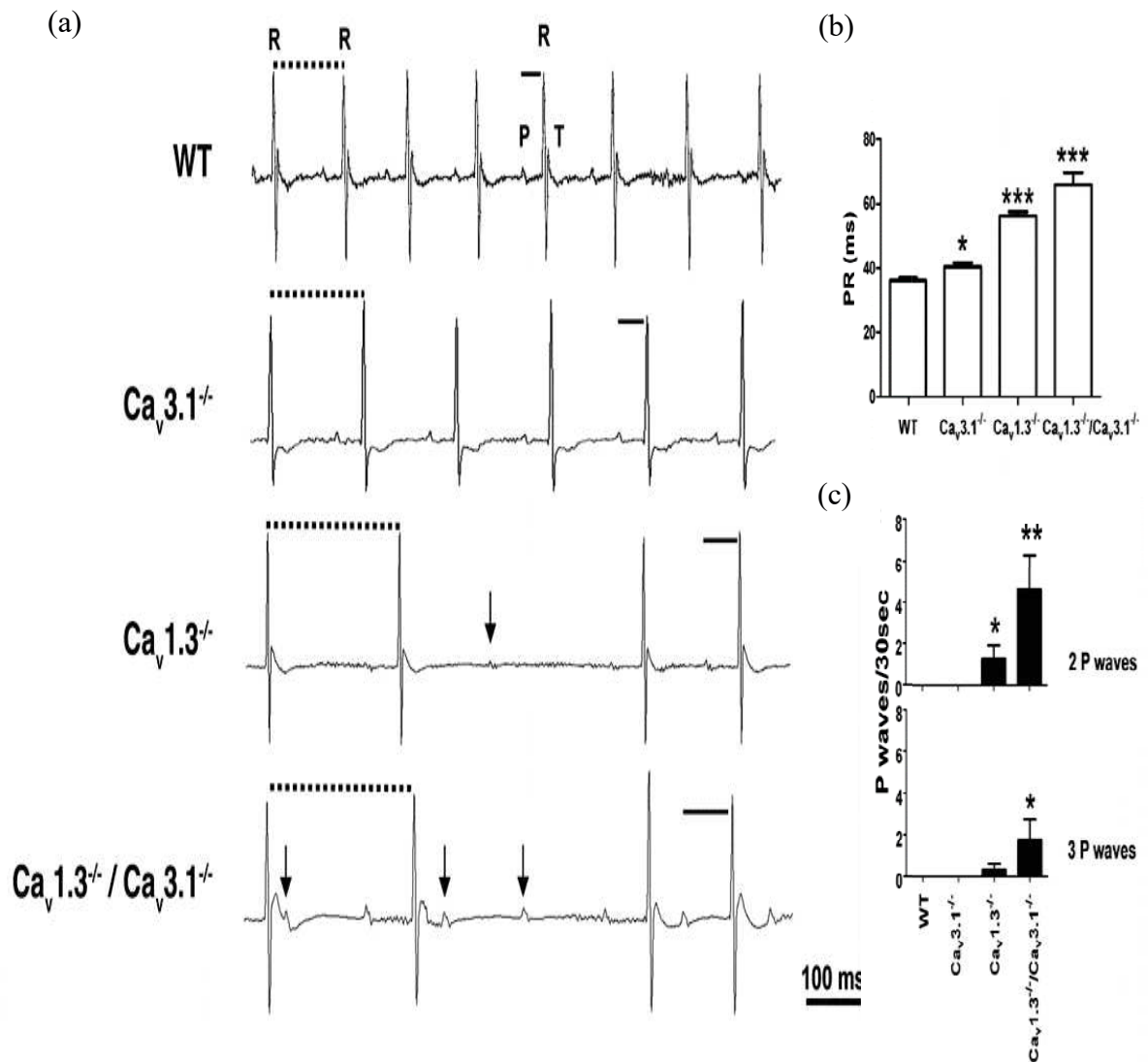


Figure 36 : Comparatif de l'activité cardiaque entre souris simple et double mutantes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les ECG in vivo des différents génotypes montrent une augmentation de l'intervalle RR avec l'addition des mutations en A. Le temps de conduction AV augmente également en B. Le nombre d'ondes P isolées symptomatiques des AVBs est exacerbé avec la double mutation (C). D'après Marger et al. 2011

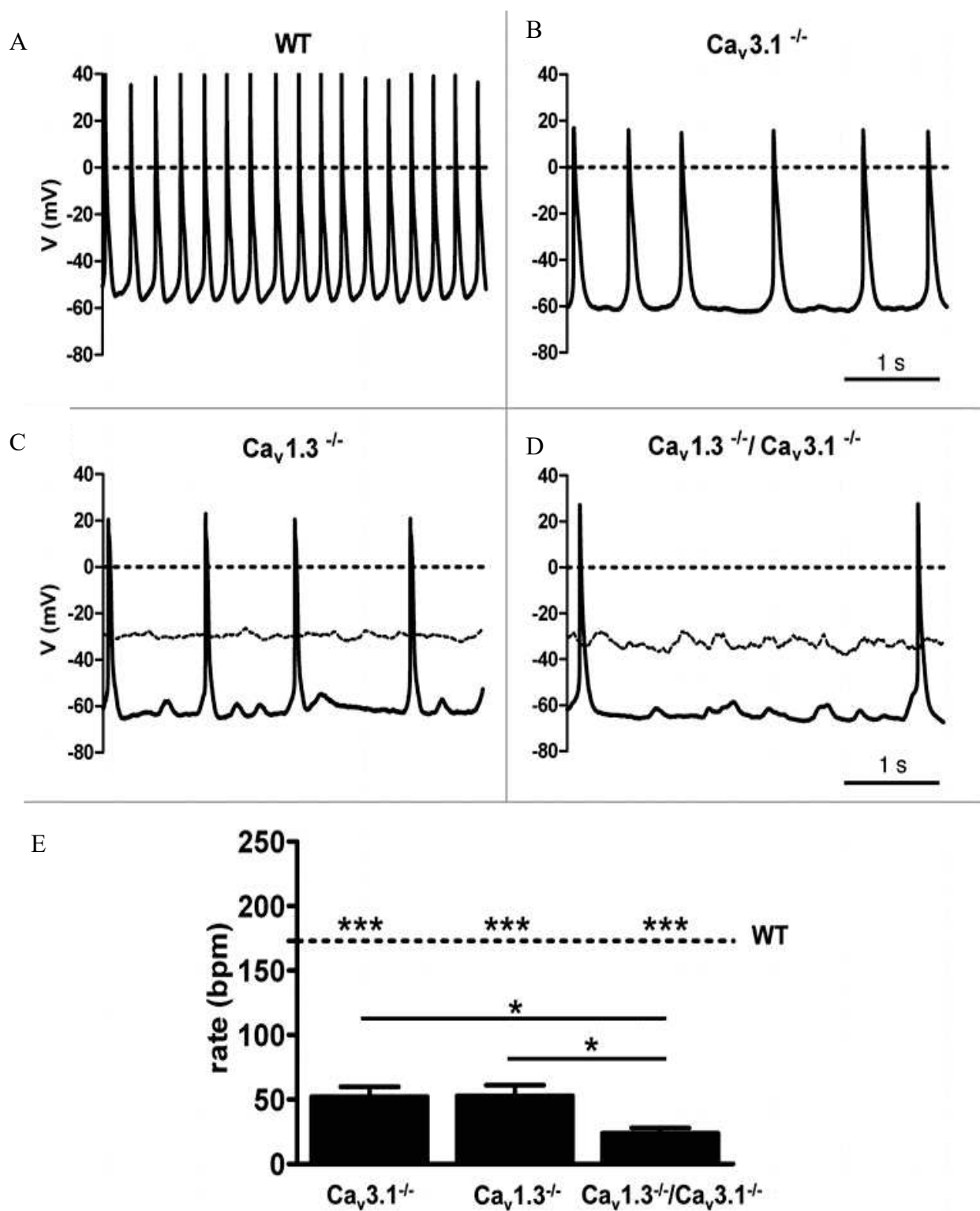


Figure 37 : Comparatif de l'activité pacemaker des cNAVs entre souris simple et double mutantes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les PAs issus de cNAVs WT (A), $Ca_v3.1^{-/-}$ (B), $Ca_v1.3^{-/-}$ (C) et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (D) enregistrés en patch clamp en condition contrôle (gris) et en injectant un courant (noir). (E) La fréquence des PAs (rate, bpm) est réduite chez le $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ en comparaison avec tous les autres génotypes. D'après Marger et al. 2011

III.3.4 Interaction entre Ca_v1.3 et le RyR2/NCX

La notion de proximité entre Ca_v1.3 et le RyR2 est importante dans les cellules *pacemaker* du NSA. I_{CaL} généré par Ca_v1.3 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 par le phénomène de CICR. Le Ca²⁺ libéré par le RS effectue un rétrocontrôle négatif sur Ca_v1.3 par le phénomène de CDI. Grâce aux animaux génétiquement modifiés, des études ont permis récemment de démontrer cette interaction qui semble faire le lien entre le Ca²⁺ clock et le membrane clock. Elles sont détaillées dans cette partie.

Mutation de RyR2

La souris RyR^{4496C} est un modèle d'étude pour CPVT. Cette mutation gain de fonction du RyR2 perturbe l'homéostasie calcique intracellulaire (Neco, Torrente et al. 2012). Elle présente un dysfonctionnement dans la réponse β adrénergique d'origine sinusale ainsi que des pauses du sinus comme chez les patients affectés par la maladie.

La dysfonction sinusale a également été étudiée *ex vivo* sur tissu chez le mutant en comparaison aux souris *WT*. On y observe que la fréquence de transitoire calcique dans le NSA y est diminuée (Figure 38) et que l'effet chronotrope de la stimulation β adrénergique n'est pas aussi efficace et qu'il est accompagné de pauses de l'activité.

Au niveau des cNSAs, le nombre de « *sparks* » correspondant à l'activité du RyR2 est plus important chez le mutant alors qu'I_{Ca} mesuré en *patch clamp* est réduit de moitié. Le nombre de sparks et de vagues calciques augmente lors de la perfusion d'ISO, autant que le stock de Ca²⁺ dans le RS diminue au cours de l'expérience. Cette dernière observation suggère que le stock du RS est un facteur qui peut être limitant dans le modèle du *Ca²⁺ clock* et qu'il peut induire les pauses du NSA observées *in vivo* et *ex vivo* chez les CPVT.

La libération excessive de Ca²⁺ par le RyR2 provoque une diminution de courant de la DD, de la fréquence et par conséquent, de l'automatisme. En effet, la libération excessive de Ca²⁺ diastolique du RS au niveau du sarcolemme provoque une forte inactivation de I_{Ca,L}, ce qui réduit la DD.

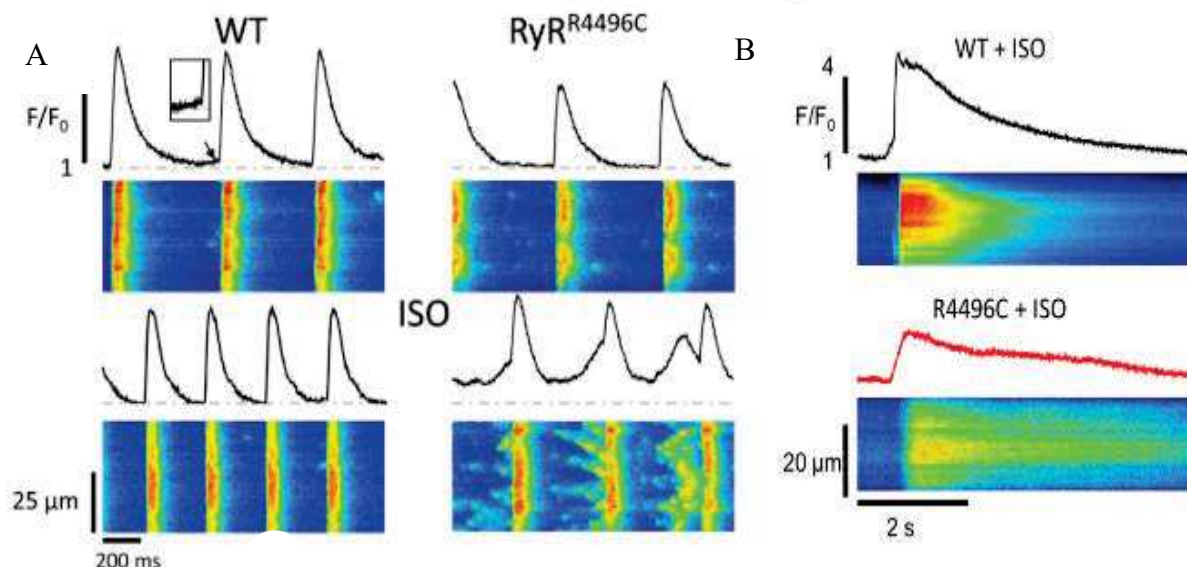


Figure 38 : Enregistrements en imagerie confocale de la libération spontanée de Ca²⁺ intracellulaire via le RyR2 dans la cNSA. A : Comparaison des transitoires systoliques calciques et de la distribution des phénomènes de sparks tout au long de la phase diastolique dans des cNSA WT et RyR^{R4496C}. L'ISO (2 nM) accentue ces phénomènes. B : La perfusion additionnelle de caféine (10 mM) décharge le Ca²⁺ contenu dans le RS. La quantité de Ca²⁺ libérée est moindre en cas de surexpression de RyR2. D'après Neco et al. 2012.

Réduction de l'activité de l'échangeur NCX

Dans le mécanisme *pacemaker*, la contribution du partenaire membranaire de RyR2, l'échangeur NCX a aussi été étudié. Des souris KO pour NCX spécifiquement dans l'oreillette (KO conditionnel) ont été générées (Torrente 2015, Torrente, Zhang et al. 2017).

La mutation de NCX est pathologique chez la souris : *in vivo*, l'onde P n'est pas visible sur les ECGs, les dépolarisations sont désorganisées et arythmiques, il y a également des défauts de conduction au niveau du tissu atrial isolé. *In vitro*, les cNSAs isolées sont quiescentes. Par contre dans les tissus intacts *ex vivo*, des phénomènes de « bouffées » (« *bursts*») de transitoires calciques sont observés par fluorescence du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 39 A) probablement en lien avec une surcharge de Ca²⁺ diastolique. Ainsi, la surcharge de Ca²⁺ provoque l'inactivation de Ca_v1.3 et diminue l'activité *pacemaker*. La stimulation de l'entrée de Ca²⁺ par l'application de BAYK8644 cause une inhibition de l'activité *pacemaker* chez le KO NCX. Par contre,

l'ajout du chélateur de Ca^{2+} BAPTA diminue le temps de quiescence entre les *bursts* de transitoires calciques et améliore l'activité spontanée du tissu NSA.

Ce résultat montre qu'en absence de NCX, l'accumulation de Ca^{2+} renforce l'inactivation calcium-dépendante et diminue $I_{\text{Ca,L}}$, avec des conséquences négatives sur l'automatisme sinusal.

Dans ce modèle KO NCX, le « *Ca²⁺ clock* » semble totalement aboli et seuls les acteurs du « *membrane clock* » seraient responsables d'une activité *pacemaker* désorganisée dans le tissu sinusal. En effet, la perfusion d'IVA réduit l'automatisme du tissu sinusal chez le KO NCX, ce qui indique que le courant I_f contribue à l'activité *pacemaker* dans ce NSA transgénique.

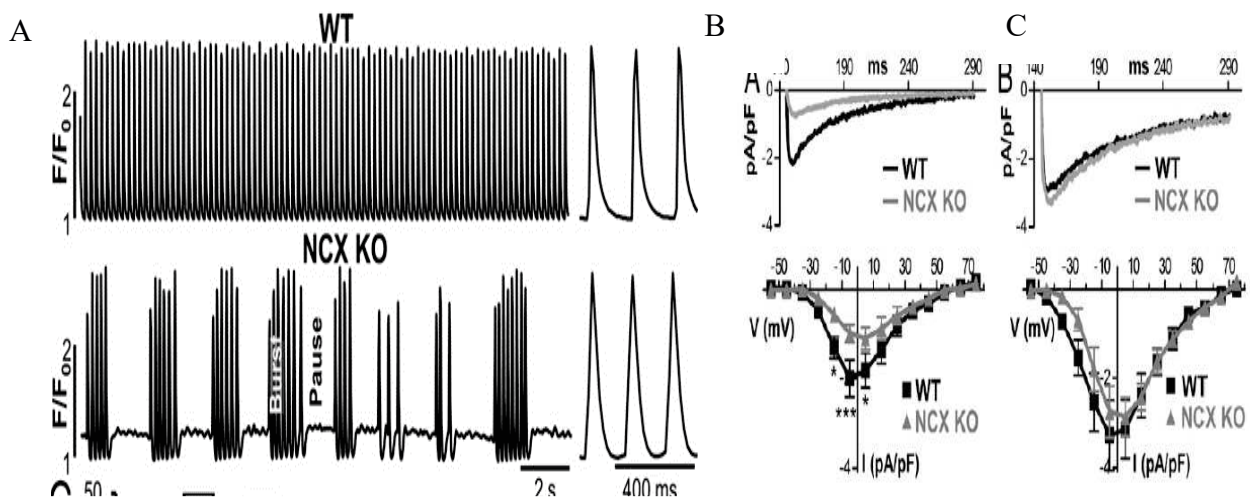


Figure 39 : Activité du NSA de la souris NCX KO. A : Enregistrements de l'activité en microscopie confocale, configuration « line scan », de la dynamique calcique intracellulaire au niveau du NSA de la souris WT et NCX KO. B : I_{Ca} en présence d'un tampon calcique (BAPTA 1 mM). C : Avec une concentration plus importante en BAPTA (10 mM). D'après Torrente et al. 2015.

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire influence les canaux K^+ repolarisants

Ce même génotype NCX KO a également permis de mettre en évidence l'implication des canaux K^+ de faible conductance, appelés canaux SK (abréviation anglophone de « *small K* »), dans le mécanisme *pacemaker* (Torrente, Zhang et al. 2017). Ces canaux indépendants du voltage sont activés par le Ca^{2+} intracellulaire.

Dans l'étude du modèle KO NCX, une forme particulière d'activité du NSA appelée « *spike adaptation* » a été relevée. Observée jusqu'alors dans les neurones et cellules chromaffines, elle correspond à un allongement du temps transitoire entre deux PAs pendant la phase de *burst* qui est attribué à la modulation des SK par le Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} diastolique induit une hyperactivité des SK pendant le *burst* jusqu'à ce que l'hyperpolarisation provoque la quiescence du NSA. Pendant la quiescence, le Ca^{2+} est progressivement éliminé probablement par la « *plasma membrane Ca^{2+} ATPase* » (PMCA), ce qui provoque une diminution du courant SK et la réactivation de l'automatisme sinusal.

Cette hypothèse a été confirmée grâce à l'utilisation du bloqueur spécifique des SK provenant du venin d'abeille : l'Apamine (Figure 40).

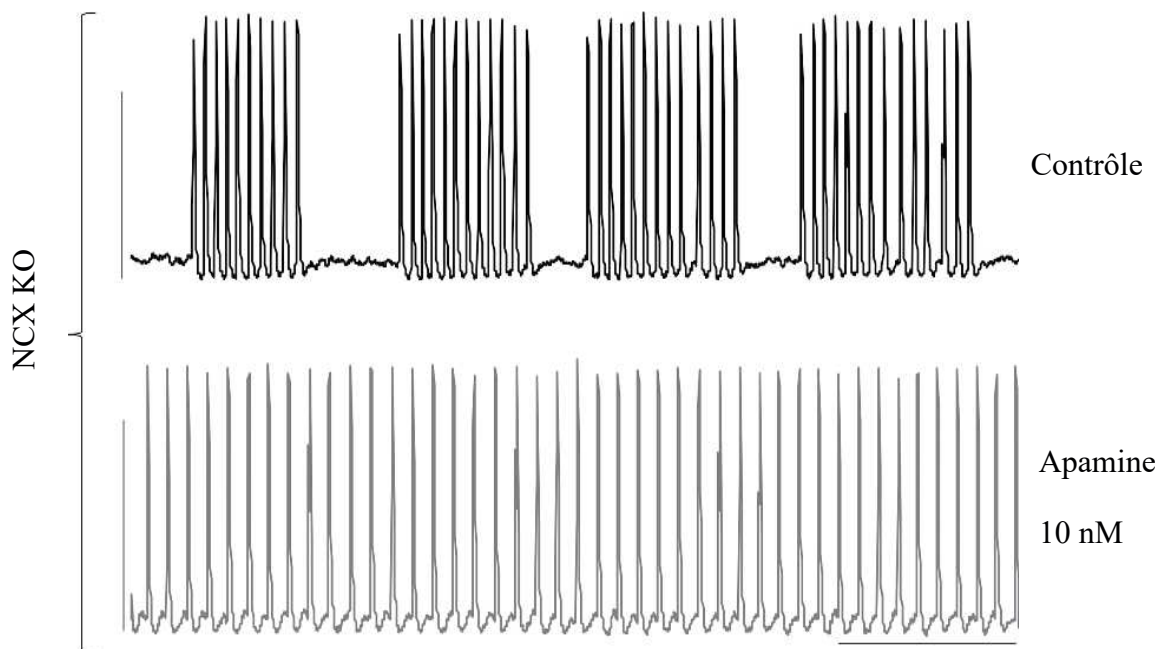


Figure 40: Effet de l'Apamine. Décharges calciques spontanées enregistrées en line scan sur le tissu sinusal avant et après perfusion de 10 nmol d'Apamine. D'après Torrente, Zhang et al. 2017.

Ca_v1.3 dans la synchronisation des LCR

Une publication récente de notre groupe souligne l'importance de Ca_v1.3 dans la coordination du mécanisme *pacemaker* (Torrente, Mesirca et al. 2016). D'après le « Ca²⁺ clock », le Ca²⁺ sortant du RyR2 sous forme de *sparks* ou LCRs participe à la phase exponentielle de la DD (EDD). Sensible à la régulation β-adrénargique, la pente de la DD devrait donc augmenter avec l'ISO, mais ce n'est pas le cas dans les cellules Ca_v1.3^{-/-} (Figure 41 D).

Les enregistrements en *patch clamp* sur cNSAs isolées de souris Ca_v1.3^{-/-} montrent des phénomènes d'altération du potentiel de membrane appelés DAD (Abréviation Anglophone pour « *Delayed After Depolarization* ») correspondant à la DD qui ne déclenche pas un PA (Figure 41 A). Ceci suggère une contribution réduite du couple RyR2/NCX en l'absence de Ca_v1.3, ce qui provoque des DADs.

Les DADs sont généralement provoquées par des concentrations de Ca²⁺ anormales. La perfusion d'ISO élève la fréquence des PAs mais n'influence pas le nombre de DAD dans les cellules Ca_v1.3^{-/-} (Figure 41 E).

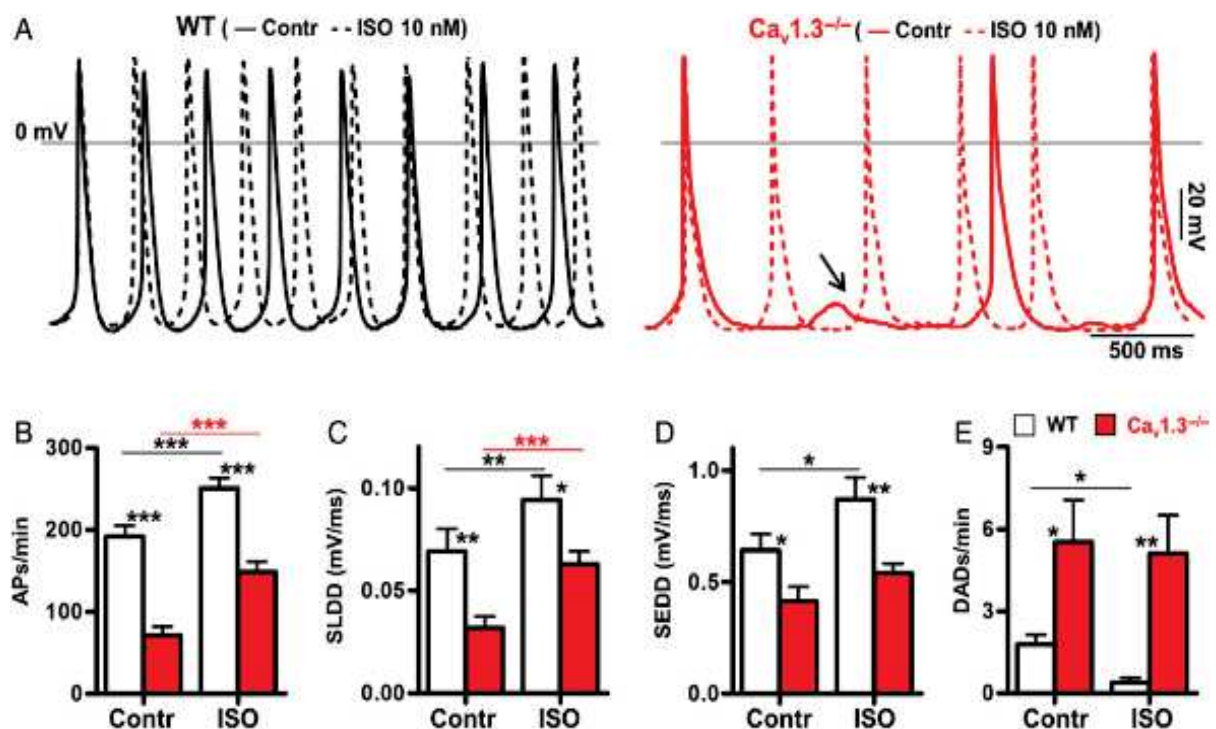


Figure 41 : Impact de l'ISO sur le potentiel de membrane de Ca_v1.3^{-/-}. A : PA des cNSA WT (noir) et Ca_v1.3^{-/-} (rouge) en condition contrôle et ISO 2 nM. B : Fréquence de PA. C & D : Pentas de la phase LDD (SLDD) et de l'EDD (SEDD). E : Nombre d'évènement DAD/min. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.

D'après les enregistrements de la libération de Ca^{2+} , les cNSAs isolées de souris $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ sont presque dépourvues de LCRs. Les paramètres de la rampe calcique durant la phase exponentielle de la DD et de la décharge transitoire calcique sont altérés mais pas ceux des LCRs (Figure 42).

Comme dans l'étude précédente, la charge du RS dans les cNSAs est mesurée à l'aide de caféine (10 mM). Ces mesures montrent que la mutation de $\text{Ca}_v1.3$ ne la modifie pas.

Donc les modifications relatives au potentiel de membrane et au calcium intracellulaire (diminution du nombre de LCRs et de la pente de la DD) ne sont pas attribuables à une altération de la récupération du Ca^{2+} dans le RS par la SERCA et de l'activité de NCX.

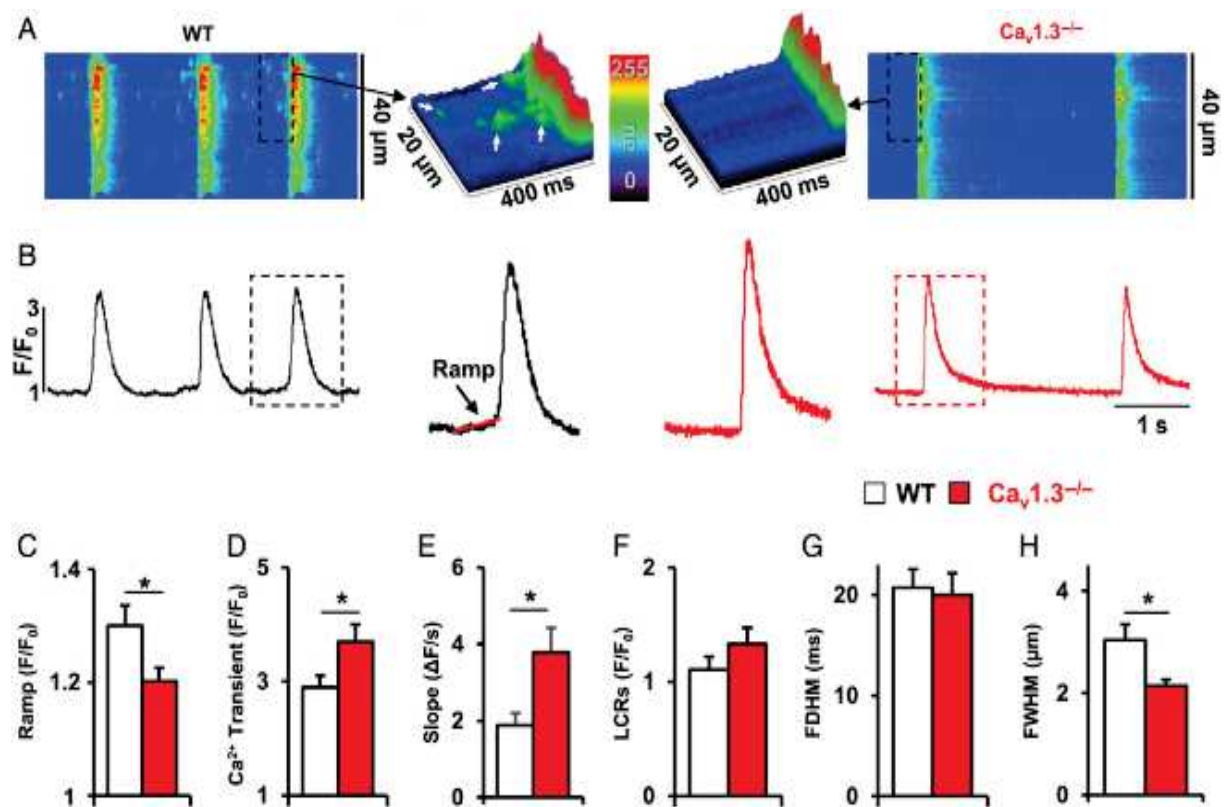


Figure 42 A : Imagerie calcique en configuration line scan sur microscope confocal sur cNSA. B : Fluorescence du Ca^{2+} enregistré en fonction du temps, se rapporte à A. C : Valeur de la rampe précédant le transitoire calcique. D et E : Amplitude et pente du transitoire calcique. F, G et H : Amplitude, durée et largeur des phénomènes de LCRs. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.

En stimulant les cNSAs avec une dose saturante d'ISO (10 nM), le nombre de transitoires calciques et de LCRs augmente avec l'activité *pacemaker* (Figure 43). Mais dans le cas de l'inactivation de $Ca_v1.3$, les LCRs ne sont pas coordonnées pendant la phase exponentielle de la DD comme chez les *WT*. Dans les cNSAs isolées de $Ca_v1.3^{-/-}$, les LCRs s'étendent pendant toute la phase diastolique ce qui repousse le déclenchement du transitoire calcique. Ce manque de synchronisation suppose l'implication de $Ca_v1.3$ dans la stimulation du CICR et par extension dans la coordination des horloges calciques et membranaires.

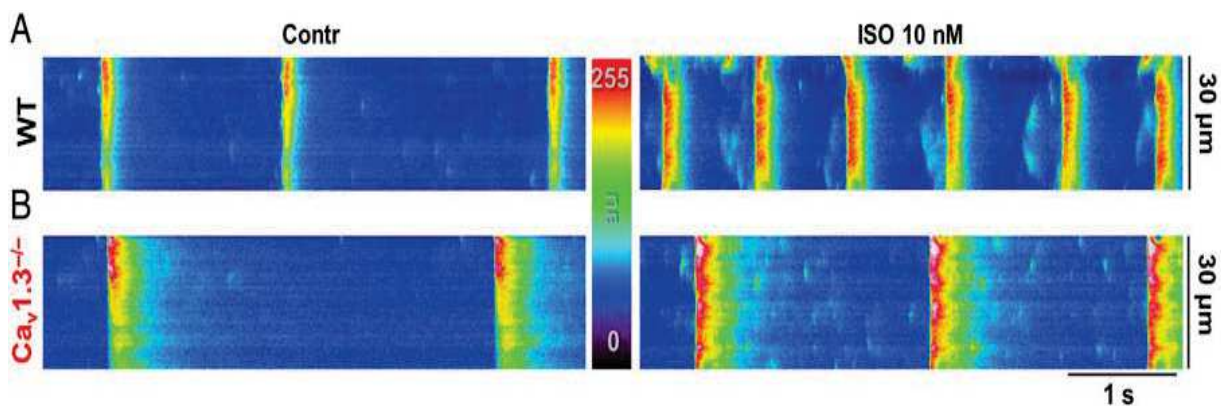


Figure 43 A et B : Imagerie calcique en microscopie confocale dans les cNSAs des souris *WT* (A) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (B) en condition saturante d'ISO 10 nM. Ces enregistrements montrent que la distribution des sparks calciques est plus éparse chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ que chez le *WT*. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.

Le seul moyen pour récupérer une activité *pacemaker* normale dans les cNSAs isolées à partir de souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a été d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca^{2+} diastolique par l'application d'une faible concentration de caféine (200 μ M). La caféine permet d'augmenter la concentration en Ca^{2+} intracellulaire qui active le CICR avec le RyR2 et I_{NCX} ainsi que l'adénylate cyclase et les états de phosphorylation.

En résumé, $Ca_v1.3$ n'est pas un simple acteur de la DD car son contrôle de l'homéostasie calcique modifie le fonctionnement de $Ca_v1.3$. Il apparaît donc comme un coordinateur des mouvements du Ca^{2+} intracellulaire (CICR, LCR) pendant la DD et de la régulation d' I_{NCX} .

Concernant l'interaction avec les TTCC, la manière dont contribue $Ca_v3.1$ est encore sujet à controverse. En 1997, J. Li et collaborateurs observent que 10 μ M de Ryanodine réduit $I_{Ca,T}$

dans les cNSAs du lapin (Li, Qu et al. 1997). J. Huser et collaborateurs, en 2000, ont montré que l'activation des TTCC augmente les phénomènes de *sparks* et stimulerait I_{NCX} dans des cellules atriales *pacemaker* dites « latentes » chez le chat (Huser, Blatter et al. 2000). Ce résultat a été appuyé en 2001 par S. Lipsius et collaborateurs qui ont montré une réduction du nombre de *sparks* en perfusant 40 μM de Ni^{2+} , suggérant un couplage $\text{Ca}_v3.1/\text{RyR2}$.

Quelques années plus tard, en 2002, T. Vinogradova et collaborateurs ont montré au contraire que 50 μM de Ni^{2+} ne réduisaient pas les phénomènes de *sparks* dans les cNSAs du lapin.

III.3.5 Contribution de Ca_v1.3 sur I_{st} (« sustained inward current »)

Dans les années 90, le japonais J. Guo sous la direction d'A. Noma a décrit pour la première fois I_{st} comme un courant Na⁺ entrant persistant pendant toute la DD dans des cNSAs du lapin. Ce que l'on sait à présent sur I_{st}, c'est qu'il présente des propriétés spécifiques similaires à celles des LTCC, à savoir une sensibilité à l'activateur BAY-K8644 et aux DHPs, il n'est pas modifié par les bloqueurs sodiques comme la TTX. I_{st} est activé à un faible voltage, perméable au Na⁺ et a une inactivation lente. Son expression dans le NSA n'est pas homogène.

Par ailleurs, une zone d'ombre persiste autour des déterminants moléculaires de ce courant, ce qui rend délicat l'évaluation de son rôle physiologique.

Récemment en 2017, le travail de F. Toyoda et collaborateurs ont montré la contribution essentielle de Ca_v1.3 dans la génération d'I_{st} grâce aux souris Ca_v1.3^{-/-} (Toyoda, Mesirca et al. 2017).

En *patch clamp* sur les cNSAs de souris; grâce à la soustraction des ions Ca²⁺ ou Na⁺ dans le milieu extracellulaire, de tests pharmacologiques (DHPs, ISO) et du génotype Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}, les résultats obtenus montrent globalement que : I_{st} est absent des cNSAs Ca_v1.3^{-/-} et que Ca_v1.3 module l'activité d'I_{st} (sensibilité aux DHPs) alors que Ca_v1.2 ne l'influence pas. De plus, les résultats d'expérience suggèrent qu'I_{Na} et I_{NCX} ne sont pas responsables d'I_{st}.

Ces découvertes récentes définissent mieux I_{st} dans sa contribution à l'activité *pacemaker* en lien avec Ca_v1.3 et ouvrent la voie à sa caractérisation moléculaire et structurale, notamment l'identification de la sous-unité $\alpha 1$ sensible aux DHPs et au Bay-K8644.

Partie IV : De la recherche fondamentale aux perspectives thérapeutiques

Les pathologies de type SSS ont pour unique traitement l'implantation d'appareil pacemaker électronique. Le nombre d'implantations est en constante augmentation à cause du vieillissement de la population qui se caractérise par l'apparition de problèmes cardiaques. Les appareils électroniques implantables commercialisés sont généralement efficaces mais présentent encore des inconvénients liés à l'appareil lui-même ou à la chirurgie qui permet de les mettre en place. S'ajoute à cela, l'incompatibilité du patient et des coûts financiers qu'il encoure. De ce fait, des nouvelles thérapies de type cellulaire ou génique émergent pour parer à ces difficultés. Les recherches et développements de ces nouveaux axes nécessitent des modèles physiopathologiques tels que nos souris KO pour les LTCC et TTCC. Les récentes publications de l'équipe de recherche de M.E. Mangoni à Montpellier présentent une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'inhibition du canal compensatoire responsable d' $I_{K_{ACh}}$ pour compenser la mutation délétère d'un courant entrant.

IV.1 Etat de l'art des traitements contre les pathologies du NSA

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité au monde. D'après le rapport de l'organisation mondiale de la santé en 2015, 17.5 millions de décès sont imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 31 % de la mortalité mondiale totale. Les pays les plus atteints sont ceux à revenu faible ou intermédiaire et, le nombre de personnes atteintes de ces pathologies augmentent de jours en jours. Cela vaut également pour la pathologie du rythme cardiaque de type SSS (Figure 44). Cet accroissement du nombre de malades est corrélé à un vieillissement de la population. Ce phénomène moderne fait du domaine de la Santé un secteur riche en investissement et en innovation.

Certes les humains vivent plus longtemps, mais ils vivent en mauvaise santé à cause de nombreux facteurs environnementaux, la sédentarité, des mauvaises habitudes de consommation et des prédispositions génétiques défavorables. Cela touche l'ensemble de la population mondiale, le continent américain et la Chine étant les pays les plus sévèrement touchés par une mauvaise hygiène alimentaire.

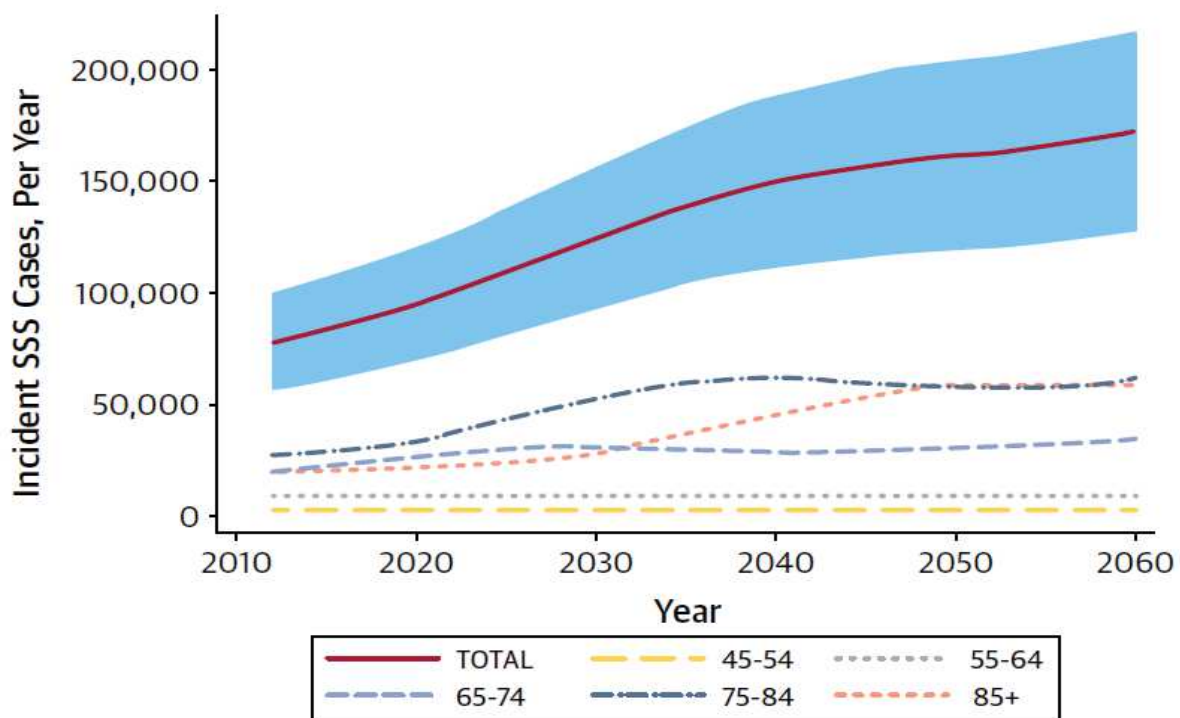


Figure 44 : Estimation du nombre de cas de SSS par an entre 2012 et 2060 aux Etats unis. D'après Jensen et al., 2014.

IV1.1 Les pacemakers/stimulateurs électroniques

- **Quelques chiffres**

D'après une étude américaine de 1993 à 2009, l'implantation de pacemaker électronique permanent n'a cessé d'augmenter aux Etats-Unis avec au total 2.9 millions d'implantations (Greenspon, Patel et al. 2012). On recense environ 1 million d'implantation chaque année dans le monde, dont 60 000 en France (HAS, 2009), 200 000 aux USA.

- **Inconvénients**

D'une part, ces appareils ont un fort coût économique, constituant un véritable facteur limitant dans les pays sans système de sécurité sociale développé et accessible. D'autre part, l'acte chirurgical présente un risque systématique. En effet, l'entretien de l'appareil peut nécessiter un remplacement de batterie ou des électrodes avec un risque d'infection de 1 % lors de chaque intervention. De plus, l'implant peut être thrombogénique au niveau des vaisseaux ou encore affecter le fonctionnement de la valve tricuspide.

D'un point de vue physiologique, l'implant électronique n'a pas la faculté de répondre au changement de tonalité du SNA de manière physiologique comme peut le faire le mécanisme *pacemaker* biologique. S'ajoute à cela une incompatibilité avec les jeunes patients atteints de complications cardiaques d'origine congénitale puisque la croissance du cœur ne permet pas une fixation à long terme d'un implant pacemaker électronique.

- **Nouvelle génération d'appareil**

Durant les dernières décennies, la technologie des appareils électroniques s'est perfectionnée, notamment avec l'apparition de l'énergie « Piézoélectrique » générée par le mouvement de l'organe lui-même qui a permis d'augmenter la durée de vie des batteries. Egalement, des pacemakers qui sont alimentés par l'énergie solaire grâce à un récepteur cutané convertisseur de l'énergie solaire en électricité sont développés. Les risques infectieux sont limités par la nouvelle génération de *pacemaker* sans sonde à fixer à l'intérieur du ventricule droit. Des programmes sensibles à la performance contractile du myocarde permettent d'estimer le rythme et à l'appareil de répondre à une accélération du rythme.

IV.1.2 Génération d'un *pacemaker* biologique

Malgré tous ces progrès en matière de source d'énergie et d'optimisation, le *pacemaker* électronique présente toujours des limites à son utilisation. Par exemple, c'est le cas chez certains patients possédant une contre-indication suite à une première implantation infructueuse ou encore en cas d'anomalie du rythme cardiaque chez l'enfant ou encore chez le fœtus présentant un CHB.

D'après les revues des spécialistes Y. Saito et d'E. Cingolani parues récemment toutes les deux en 2018, les avancées basées sur des thérapies cellulaires ou géniques sont encourageantes mais encore trop incertaines pour des applications cliniques (Cingolani, Goldhaber et al. 2018, Saito, Nakamura et al. 2018). La création de pacemakers dit « biologiques » est un axe de recherche en développement ces dernières années pour trouver une alternative au pacemaker électronique. Le but est de générer une région *pacemaker* ectopique qui pourrait suppléer ou soutenir le NSA en cas de défaillance de celui-ci. La compréhension du système métabolique cellulaire du *pacemaker* est indispensable pour en créer une copie. Les chercheurs s'intéressent à la spontanéité de la cNSA qu'ils essayent de reproduire en exprimant les courants *pacemakers* caractéristiques de plusieurs manières (Figure 45).

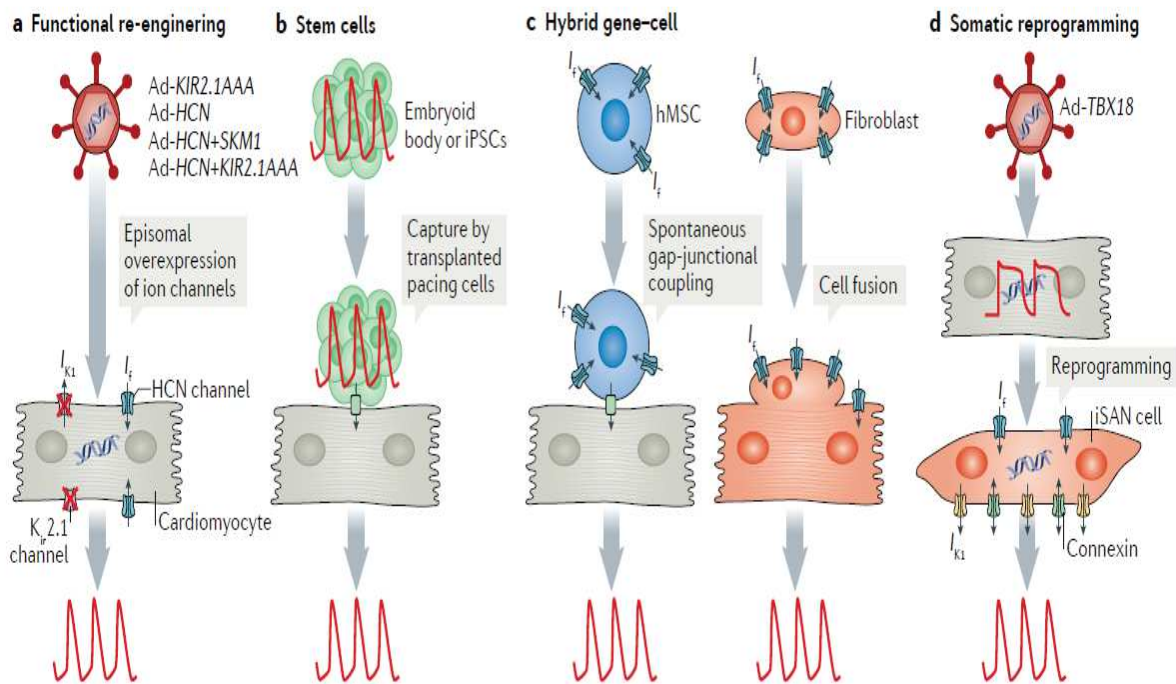


Figure 45 : Les différentes stratégies innovantes ayant pour but de créer un pacemaker biologique. a : Des adénovirus sont utilisés pour surexprimer directement HCN et réduire $K_{ir2.1}$ dans un cardiomyocyte classique. b : Une approche avec des cellules souches d'origine embryonnaire, pluripotentes implantées autour du myocarde peut créer une région pacemaker. c : On appelle « hybride » l'approche utilisant des cellules humaines de type mésenchymateuse utilisées pour se coupler à un cardiomyocyte par une jonction gap et délivrer les gènes nécessaires à l'expression d'HCN par exemple. d : La reprogrammation de cellules somatiques en cNSA est possible grâce à la surexpression de la T-box de transcription TBX18 via un adénovirus comme dans a. Sauf que la T-box est en amont de l'expression des canaux ioniques. D'après la revue de Cingolani et al., 2018.

Thérapies géniques

Les premiers essais de thérapie génique ciblant l'automatisme ont débuté dans les années 90. Ils ont consisté à sur-exprimer des récepteurs β adrénergiques d'humains chez la souris puis le porc afin d'améliorer l'activité du NSA (Edelberg, Aird et al. 1998, Edelberg, Huang et al. 2001).

En 2002, une nouvelle étude axe sa stratégie sur l'inhibition du courant rectifiant I_{K1} . Chez le cobaye, la suppression d' I_{K1} offre à des cardiomyocytes ventriculaires la capacité de générer une activité spontanée mais ne crée pas une véritable structure fonctionnelle semblable au NSA (Miake, Marban et al. 2002).

Puis de nouvelles stratégies de thérapie génique ont consisté à sur-exprimer un élément du *pacemaker* tel qu' I_f . Des adénovirus visant la transduction d'HCN2 sont injectés dans le ventricule gauche chez le chien. Quatre jours plus tard, une activité spontanée est observée dans le ventricule gauche sous inhibition du tonus vagal (Qu, Plotnikov et al. 2003).

Ces premières études ont démontré qu'un remodelage génétique permettait de créer une activité *pacemaker* par un remodelage génétique et ont servi de base à d'autres études. Comme en 2013, où une équipe combine une stratégie d'adénovirus exprimant HCN2 et skM1 qui est un canal sodique dont les paramètres d'ouverture et de fermeture facilitent l'activité spontanée en diminuant le seuil de déclenchement de PA (Boink, Duan et al. 2013).

Une autre thérapie génique plus récente vise les facteurs de transcription permettant la différenciation cellulaire : elle est appelée « reprogrammation somatique ». Le but est d'obtenir des cNSAs *pacemaker* en induisant des voies de différenciation, ou bien en inhibant une des voies inverses (Figure 46).

Les facteurs de transcription embryonnaires TBX18 et TBX3 favorisent la différenciation en cNSA. TBX18 est impliqué dans la structure cellulaire et inhibe la différenciation en cellules atriales (Wiese, Grieskamp et al. 2009). L'injection d'adénovirus TBX18 dans le ventricule gauche du porc réduit significativement les AVBs et rétablit un rythme cardiaque normal (Hu, Dawkins et al. 2014). L'effet n'est que temporaire et limitant car le vecteur adénovirus n'intègre pas le génome. Le niveau d'expression de différents gènes change : Cx43, Kir2.1, Nkx2-5 et Nav1.5 sont sous-régulés alors qu'HCN4 augmente comme dans le profil des cNSAs induites in vitro (Kapoor, Liang et al. 2013). Cette stratégie est pour l'instant la seule à être testée sur des modèles de gros animaux présentant des AVBs.

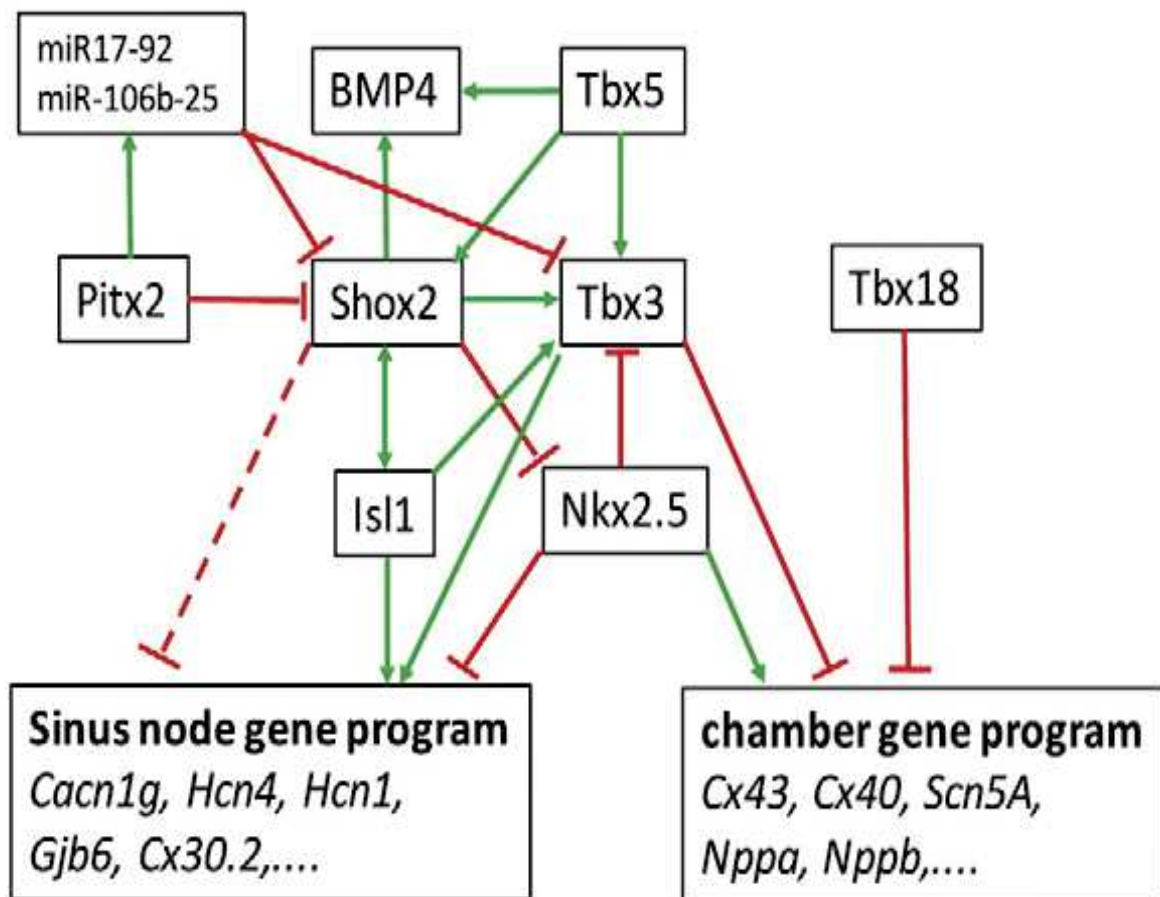


Figure 46 : Réseau transcriptionnel d'influence déterminant le développement du NSA. D'après J.H. van Weerd et V.M. Christoffels, 2016

Thérapies cellulaires

Deux types de cellules sont utilisées comme base pour l'élaboration de pacemaker biologique : les cellules souches mésenchymateuses (*Mesenchymal stem cell*, MSC) et les cellules souches pluripotentes (PSC). Plusieurs exemples de leur utilisation :

En effet les MSC sont capables de se différencier en plusieurs types de cellule mésodermique dont les myocytes. Elles créent facilement un couplage électrique grâce à la forte expression de Cx40 et 43 et génèrent un courant I_f lorsqu'elles sont transfectées avec HCN1, 2 ou 4 (Rosen, Brink et al. 2004).

Une étude préclinique chinoise sur le porc a montré un effet de l'injection de MSC transfectées avec le gène d'HCN4 sur la sensibilité du cœur à la réponse β -adrénergique, ce qui prouve un ancrage de ces cellules au niveau cardiaque (Zhang, Li et al. 2013).

Toutefois, les MSC migrent et se différencient en d'autres cellules *in vivo* et c'est cette instabilité qui limite l'utilisation de ce type cellulaire.

Le deuxième type cellulaire (PSC) est plus largement utilisé dans la recherche. Les PSC sont soit des cellules souches pluripotentes induites (« iPSC », cellule adulte somatique dérivée en cellule souche par des facteurs de croissance) ou d'origine embryonnaire (« ESC ») et ont la capacité de se différencier en tout autre type cellulaire.

Les cellules PSC dérivées en cardiomyocytes ont la capacité de produire une activité *pacemaker* grâce à l'expression des canaux ioniques et aux récepteurs nécessaires à la génération de cette activité, la propagation et la modulation de l'impulsion. Mais cette activité est insuffisante pour suppléer celle du NSA.

Dans une étude récente, des ESC de souris ont été transfectées avec le gène HCN4 du lapin puis différenciées en cardiomyocytes (Saito, Nakamura et al. 2015). Certaines cellules sur-expriment HCN4 (X3) tout en sous-exprimant le gène *Kcnj2* codant pour Kir2.1, essentiel pour la génération du courant I_{K1} . Ces cellules présentant un courant I_f important et des battements spontanés à fréquence rapide, répondent à l'IVA et à l'ISO. Placées en co-culture avec des cardiomyocytes dérivés d'iPSC d'origine humaine, elles ont la capacité de générer une activité *pacemaker* de manière synchronisée. Elles ont donc été décrites *in vitro* comme *pacemaker* biologique potentiel de par leur profil électrogénique. Par la suite, cette même équipe a testé ce

type cellulaire sur-exprimant HCN4 dans des modèles de rat développant des AVBs (Saito, Nakamura et al. 2018) et a observé que ces cellules pouvaient créer un nouveau rythme ectopique suffisant pour être un *pacemaker* biologique.

S. Chauveau et collaborateurs en 2017 ont publié une étude sur des cellules *pacemaker* issues d'ESC implantées *in vivo*. Ils ont utilisé le chien comme modèle d'étude, prélevant des ESC pour les dériver en cellules *pacemakers* et les implanter chez le même individu. L'avantage de cette technique est d'éliminer toute réponse immunitaire relative à la greffe des cellules. Le résultat de cette étude est encourageant puisque ces cellules injectées constituent un *pacemaker* biologique dans 50 % des animaux à partir de 4 semaines et sont par ailleurs capables de répondre à une stimulation β -adrénergique (Chauveau, Anyukhovskiy et al. 2017).

D'autres approches dites « hybrides » ont été développées, utilisant des MSC ou des fibroblastes comme vecteur à la place de vecteur viral pour délivrer des éléments *pacemaker* comme HCN (Cho, Kashiwakura et al. 2007, Plotnikov, Shlapakova et al. 2007). Elles permettent de limiter le rejet sans nécessiter l'immunosuppression.

Une autre étude a également montré que la différenciation de PSC d'origine humaine pouvait mener à un *pacemaker* biologique en se focalisant sur le progéniteur Nkx2-5 qui inhibe la différenciation en cellule *pacemaker* et favorise la différenciation en cellule atriale et ventriculaire. Les cellules appelées « *SAN-like pacemaker cells* » et identifiées Nkx2-5⁻ ont été également transplantées dans le cœur du rat et génèrent un rythme ectopique dans le tissu cardiaque (Protze, Liu et al. 2017).

Que manque-t-il au pacemaker biologique pour être développé ?

Il n'a encore jamais été montré que la transplantation de pacemaker biologique d'origine génique ou cellulaire ait permis de retrouver efficacement un rythme cardiaque viable dans un modèle de gros animal présentant une bradycardie.

Une technologie de diffusion plus précise et plus stable des cellules ou d'adénovirus semble la solution pour obtenir un ciblage plus efficace et diminuer la migration non contrôlée de ces effecteurs dans l'organisme car le risque est en effet d'avoir une prolifération cellulaire tumorigène.

IV.2 Nouveau concept du « ciblage compensatoire du canal »

Dans notre groupe dirigé par Matteo Elia Mangoni, nous avons développé une stratégie thérapeutique efficace appelée « ciblage compensatoire du canal ». Cette stratégie consiste à inhiber le système parasympathique, spécifiquement $I_{K_{ACH}}$ (GIRK4), qui est un courant sortant de K^+ sous le contrôle de la voie muscarinique et de l'adénosine impliquant des protéines G. Ce courant sortant s'oppose à l'effet dépolarisant des courants entrants I_f et I_{Ca} de la DD, ce qui génère un équilibre qui permet l'automatisme normal.

Lors de l'activation du récepteur M2, la pente de la DD se réduit à cause de l'activation d' $I_{K_{ACH}}$ et de la réduction de la concentration d'AMPC. Il en résulte une diminution du degré de phosphorylation de $Ca_v1.3$ (et possiblement de $Ca_v3.1$) et de l'activation d'HCN4. En cas de perte de fonction d'un canal favorisant la DD comme $Ca_v1.3$, il se crée un déséquilibre entre courants entrants et sortants ($I_{K_{ACH}}$) qui génère la dysfonction sinusale (Figure 47). Le ciblage génétique ou pharmacologique d' $I_{K_{ACH}}$ rétablit l'équilibre entre courants entrants et sortants de la cellule automatique. Pour ces raisons, le ciblage d' $I_{K_{ACH}}$ est dit « compensatoire » (« *compensatory channel targeting* »).

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'identification des causes génétiques de dysfonction sinusale d'origine congénitale, notamment les mutations de $Ca_v1.3$ et HCN4, a permis la création de modèles de souris en accord avec les observations cliniques. Les modèles $Ca_v1.3^{-/-}$ et HCN4-AYA ont donc été utilisés dans nos études sur le ciblage compensatoire du canal $I_{K_{ACH}}$.

D'après une première étude publiée en 2014 avec le modèle conditionnel HCN4-AYA, les animaux présentent une bradycardie, des AVBs et des tachycardies ventriculaires arythmiques. L'inactivation du gène codant pour le canal activé par la protéine G (GIRK4) rétablit une activité normale en régularisant le rythme et la fréquence cardiaque (Mesirca, Alig et al. 2014).

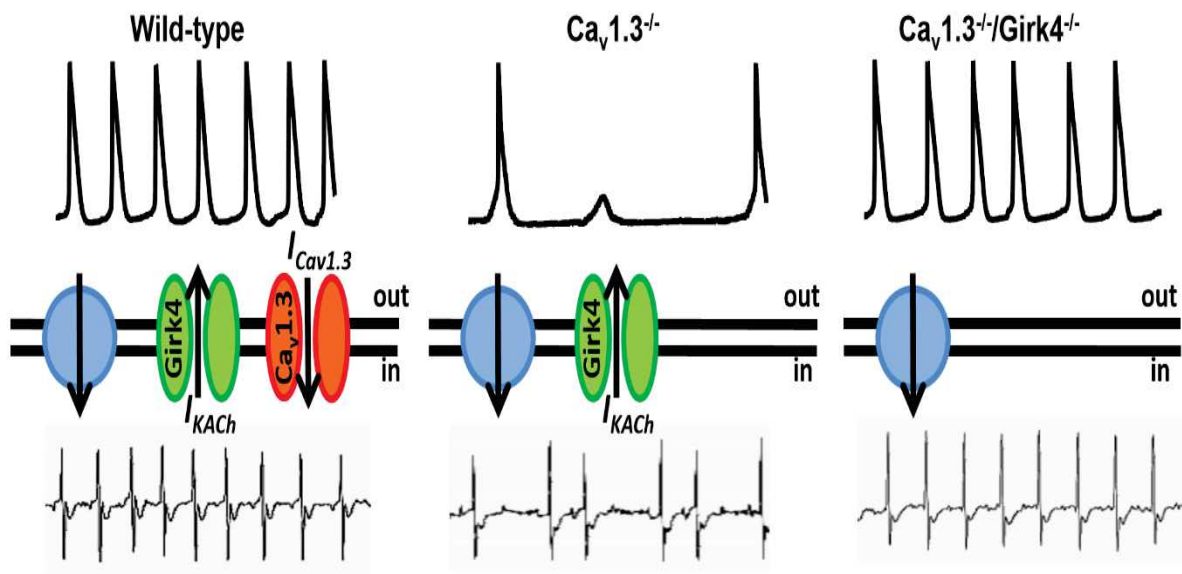


Figure 47 : Concept de « ciblage compensatoire du canal ». L'automatisme d'une cellule pacemaker est représenté pour chaque génotype, en équilibre chez le WT et pathologique chez le mutant $Ca_v1.3^{-/-}$. Il est normalisé avec la mutation additionnelle de $GIRK4$ ($GIRK4^{-/-}$). D'après Mangoni et al. 2018.

En 2016, l'équipe applique cette même stratégie pour rétablir un rythme cardiaque normal sur les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (modèle de SSS) avec succès (Mesirca, Bidaud et al. 2016), prouvant une seconde fois l'efficacité de cette stratégie. En annexe, la publication de P. Mesirca et collaborateurs est ma première collaboration. Ces études font le pont entre la recherche fondamentale sur le mécanisme *pacemaker* et des possibles applications cliniques. Cette nouvelle stratégie thérapeutique innovante commence à susciter un intérêt chez les cliniciens. En mars 2018, un article présentant cette stratégie et les études associées paraît dans les Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux « Pratique ». Associé à la société française de cardiologie, ce journal consacre une place centrale à la formation médicale continue (article à voir en annexe après la publication de P. Mesirca ci-contre).

PROBLEMATIQUE

Le rôle des canaux calciques voltage-dépendants (VDCCs) dans la génération de l'automatisme cardiaque n'est pas encore complètement élucidé. L'automatisme est généré par une phase particulière du potentiel d'action (PA) appelée dépolarisation diastolique (DD) qui conduit le potentiel de membrane de la fin de la repolarisation au seuil du potentiel d'action suivant. En termes d'expression de VDCCs, les cardiomyocytes contractiles expriment les canaux de type L $Ca_v1.2$ qui couplent le PA à la contraction. Les cellules automatiques dites « *pacemaker* » se distinguent par l'expression additionnelle des canaux de type T $Ca_v3.1$ et des canaux de type L $Ca_v1.3$. Les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v1.3$ s'activent durant la DD, tandis que les canaux $Ca_v1.2$ s'activent au cours du PA. D'autres canaux ioniques membranaires contribuent à la DD en plus des canaux calciques. Les plus importants sont les canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation f-(HCN4) sensibles à l'Ivabradine (molécule active du Procoralan) et les canaux Na^+ voltage-dépendants sensibles à la TTX, $Na_v1.1$. Puis au cours des 15 dernières années, il a été montré que les libérations locales de Ca^{2+} (LCRs) par les récepteurs à la Ryanodine (RyRs) du réticulum sarcoplasmique (RS) génèrent l'activité *pacemaker* via le couplage avec l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX), selon le modèle du « *Ca²⁺ clock* ». D'après le modèle du « *Ca²⁺ clock* », le couplage entre les LCRs et NCX est un phénomène spontané et rythmique qui ne dépend que de la charge en Ca^{2+} du RS et non de l'activité des canaux voltage-dépendants de la membrane.

Afin de bien comprendre les mécanismes régulateurs de l'activité *pacemaker*, nous avons généré une lignée de souris double *knockout* (KO) pour les VDCCs de la DD $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) afin :

1. D'étudier le rôle de $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ dans l'automatisme cardiaque en utilisant une approche intégrant plusieurs techniques d'électrophysiologie et d'imagerie *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*.
2. D'identifier le(s) mécanisme(s) de génération de l'automatisme résiduel, suite à la perte de fonction de ces canaux. Pour ceci, nous avons utilisé la TTX et l'Ivabradine pour inhiber les canaux correspondant au courant I_f et $Na_v1.1$.

3. D'étudier l'état fonctionnel du « Ca^{2+} clock » dans les cellules *pacemaker* $Ca_v1.3^{-}/Ca_v3.1^{-}$. Les cellules *pacemaker* de la souris $Ca_v1.3^{-}/Ca_v3.1^{-}$ sont dépourvues de courant calcique au cours de la DD et l'entrée de Ca^{2+} contrôlant la charge du SR se fait uniquement *via* les canaux $Ca_v1.2$.
4. Et de comprendre si le couplage entre LCRs spontanées et NCX peut générer un automatisme viable en l'absence des VDCCs de la DD dans les cellules *pacemaker* $Ca_v1.3^{-}/Ca_v3.1^{-}$?

MATERIELS ET METHODES

Modèles animaux



Notre étude a été réalisée conformément au Guide de protection et d'utilisation des animaux en laboratoire publié par le NIH (National Institutes of Health ; 8^{ème} édition) ainsi qu'aux directives européennes (2010/63/EU); et approuvé par le Ministère français de l'Agriculture (agrément N° D34-172-13).

Les modèles murins qui ont été utilisés dans notre étude ont un fond génétique C57BL/6J (Société Charles River ou Janvier Labs). Il s'agit de modèles adaptés pour la recherche translationnelle utilisés par l'équipe depuis plusieurs années et ayant permis de nombreuses publications. Les souris sont élevées sur le plateau *iExplore* de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), en secteur EOPS. Elles sont stabulées à une température constante comprise entre 21 et 22 °C et sont soumises à un rythme nyctéméral imposé de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Elles ont un accès *ad libitum* à l'eau de boisson et à la nourriture.

Les pathologies liées au rythme cardiaque étant liées à l'âge, les souris utilisées pour le prélèvement d'organe, de tissu ou de cellules sont jeunes, âgées de 6 à 8 semaines, mâle ou femelle. Dans les cas d'implantations de transmetteurs télémétriques, les souris utilisées ont un âge supérieur à 8 semaines à cause d'un poids minimum requis (supérieur à 17 grammes).

Les souris sauvages ou *Wild type (WT)* proviennent des fournisseurs Janvier Labs et Charles River. Les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ proviennent d'un élevage de l'équipe de P. Lory « canaux ioniques – excitabilité neuronale et canalopathies » de l'IGF. Cette lignée est maintenue stable grâce à des croisements d'individus KO depuis plusieurs générations.

Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ ont été générées à partir de la lignée de Jörg Striessnig de l'Institut de Pharmacie d'Innsbruck en Autriche. Les souris KO homozygotes $Ca_v1.3^{-/-}$ sont difficiles à obtenir, le rendement de la reproduction est faible, probablement à cause d'un fort taux de létalité à la naissance ou *in utero* ainsi qu'une baisse de la fertilité chez les adultes.

A l'IGF de Montpellier, au sein de notre équipe « Physiopathologie cardiaque et cardioprotection », les deux modèles de souris $Ca_v3.1^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$ ont été croisés afin d'obtenir le nouveau génotype complexe $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ utilisé pour mes travaux de thèse.

Enregistrement téléométrique des ECG *in vivo*

L'enregistrement en continu des ECG est réalisé sur des souris vigiles grâce au système développé par la société *Data Sciences International* (St. Paul, MN, USA) (Figure 48). Le principe de cette technique consiste à capturer les signaux téléométriques entre le transmetteur (ETA-F10 – 1.6 grammes), implanté en sous-cutané chez la souris, et la plaque réceptrice, située sous la cage de la souris. Les signaux téléométriques ECG sont convertis en signaux analogiques puis transmis vers un ordinateur. Les signaux sont enregistrés en continu à la fréquence d'échantillonnage de 2000 Hz. Les électrocardiogrammes obtenus sont ensuite analysés avec le logiciel spécifique ECG auto 1.5.7 (EMKA, Paris, France).

Implantation des transmetteurs en sous-cutané

Anesthésie : La souris est anesthésiée à l'isoflurane dans la cage d'induction. L'induction de l'anesthésie est effectuée avec une concentration d'isoflurane comprise entre 2.5 et 3 %. La fréquence respiratoire de la souris doit rester régulière et lente. Si elle devient saccadée, le pourcentage d'isoflurane est réduit à 2 %. Une fois que la souris est anesthésiée, elle est transférée hors de la cage d'induction : un masque est maintenu sur son museau pendant toute la durée de l'intervention. L'entretien de l'anesthésie est réalisé avec une concentration d'isoflurane variant de 1.5 à 2 %. Pendant toute la durée de l'intervention, la souris est maintenue sous une lampe chauffante, afin de prévenir l'hypothermie.

Médication pré et post opératoire : Après la tonte du pelage d'une partie de la peau du dos et du thorax, la peau de la souris est abondamment désinfectée à la Bétadine® dermique à 10 %. Une solution de lidocaïne (4 mg/kg) est administrée localement sur les tissus avant leur incision.

Avant la fermeture des incisions cutanées (ayant servi à l'introduction des transmetteurs ECG sous la peau), de la lidocaïne (4 mg/kg) est appliquée localement sur les plans cutanés et sous-cutanés. Après la fermeture des incisions, on applique de la Bétadine® dermique à 10 % sur les sutures.

Pendant les 24 h précédant l'implantation et durant les 4 jours suivant l'intervention, de l'Advil® (enfants / nourrissons à 20 mg/kg) est introduit à raison de 7 ml/L dans l'eau de boisson des souris.

Protocole chirurgical : Une incision longitudinale de 2 centimètres est pratiquée dans le dos, deux petites incisions (< 5 mm) transversales sont également réalisées sur la face ventrale (une sous le sternum et la seconde au-dessous de la clavicule droite). Les adhérences entre la peau et le tissu conjonctif sous-cutané sont sectionnées à l'aide d'un ciseau à bouts ronds. Le transmetteur ECG, traité auparavant dans une solution désinfectante (Stéranios®20) puis rincé à l'eau, est introduit au niveau de la fente dorsale. Les deux fils sont acheminés sous la peau vers le thorax. L'un est ressorti au niveau de l'incision du sternum, le second en dessous de la clavicule droite. Des petits points sont réalisés, avec du fil Prolène 5.0, afin de maintenir en place les fils du transmetteur sur le muscle intercostal. Il faut vérifier que la partie dénudée de l'électrode est parallèle et en contact direct avec le muscle. Les incisions cutanées sont ensuite suturées (2 à 3 points / incision) en présence de solution de lidocaïne (4 mg/kg) puis badigeonnées à la Bétadine® dermique à 10 %.

Condition d'observation et d'entretien des animaux opérés : Tout au long de l'anesthésie, l'analgésie (par pincement de la patte postérieure) et la fréquence respiratoire sont contrôlées. Le réveil de la souris s'effectue dans une cage de réanimation thermostatée (35 °C), en assurant une humidification appropriée, sous apport d'O₂. Dans la phase post-opératoire, l'animal est surveillé. Il est maintenu en vie s'il récupère normalement de la chirurgie (respiration autonome et normale ; diurèse normale, reprise de l'activité, toilette, ...). Dans le cas où la souris présente un signe de souffrance, que sa respiration est difficile, où qu'une perte de poids est constatée, l'euthanasie est pratiquée par dislocation cervicale, après administration d'une dose d'anesthésique.

Expérimentation post-opératoire : Les premiers enregistrements électrocardiographiques sont réalisés environ 10 jours après la pose du transmetteur ECG sous-cutané.

Enregistrement des ECG *in vivo*

La température de la pièce dans laquelle les enregistrements ECG sont réalisés est contrôlée entre 21 et 22 °C. La souris étant un animal nocturne, le cycle lumineux est inversé pour pouvoir réaliser l'expérimentation pendant la phase d'activité des souris. Chaque cage contenant une souris implantée est placée sur une plateforme réceptrice du signal. Le signal télémétrique analogue du transmetteur est enregistré et converti en digital par le système d'acquisition pour pouvoir être lu et analysé sur le logiciel Dataquest A.R.T.TM.

Chaque série d'enregistrements débute par un enregistrement de l'ECG durant 24 h. Ceci permet de déterminer la fréquence cardiaque basale de chaque souris et de repérer sa fréquence cardiaque pendant les 12 h de lumière (phase de repos) et les 12 h d'obscurité (phase d'activité). Pour les différentes injections, pratiquées en intrapéritonéal, l'ECG basal est enregistré pendant environ 4h avant l'injection. L'effet de l'injection sur la fréquence cardiaque est suivi pendant 5 h environ. Les injections successives sont distantes de 48h.

Solutions injectées :

- NaCl (contrôle)
- ISO (0.1 mg/kg)
- Atropine (0.5 mg/kg, Atropine Sulfate 0.25 mg/ml – Aguettant, France)
- Propranolol (5 mg/kg, Karnodyl[®] 5 mg/ml – Astra-Zeneca, Royaume-Uni)
- Atropine + Propranolol (mêmes concentrations)
- IVA (1, 3 et 6 mg/kg, Technologie Servier, France)

Analyse des ECG *in vivo*

Les paramètres des ECG sont analysés avec le logiciel ECG auto 1.5.7 (EMKA, Paris, France). Le rythme cardiaque (« *heart rate* », HR) est déterminé par l'intervalle de temps RR (ms) entre deux complexes QRS ; il est relevé à des intervalles de 5 minutes toutes les 30 minutes pour obtenir une moyenne sur chaque souris. Le spectre de la variabilité du rythme (« *HR variability* », HRV) est analysé pour déterminer le degré de fluctuation au sein de l'ECG. Il correspond au graphique à points (« *dot plot* ») dans la partie résultat.

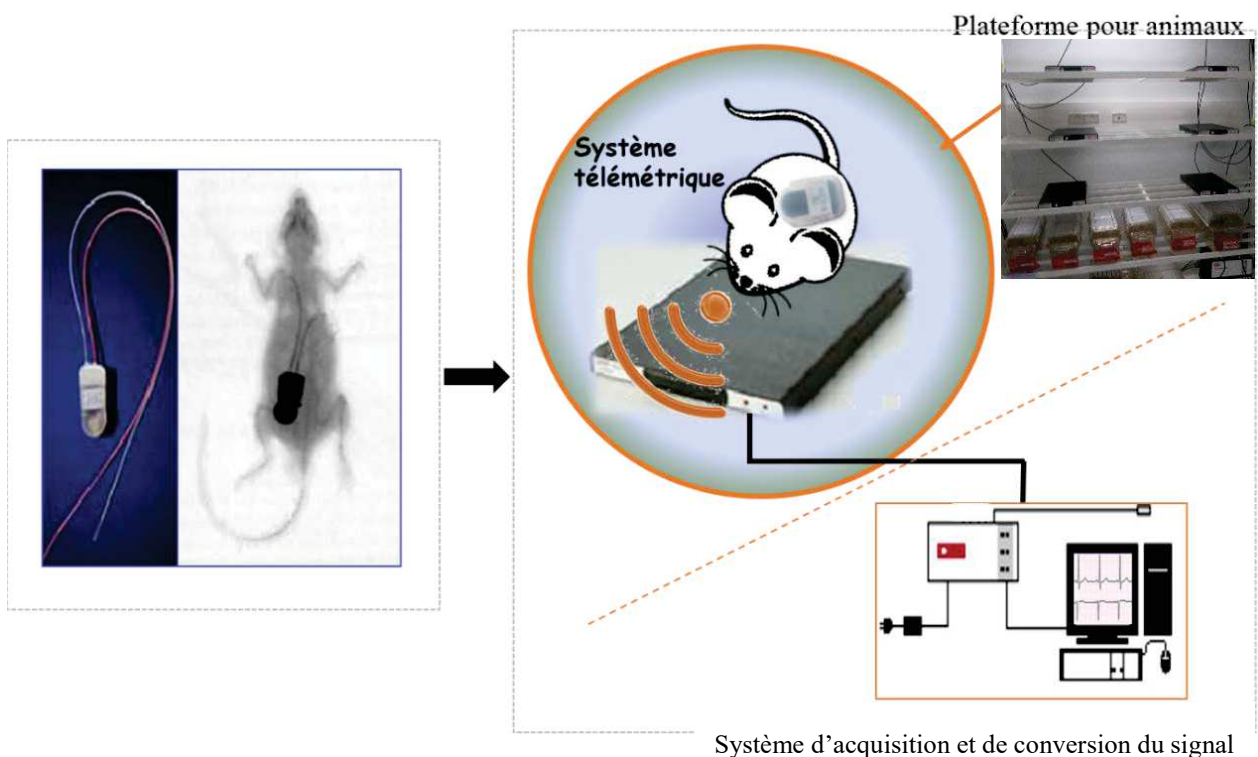


Figure 48 : Système d'acquisition d'électrocardiogramme *in vivo*. A gauche, une photographie du transmetteur et une radiographie d'un animal implanté. A droite, une illustration du système d'acquisition du signal télémétrique avec une image d'une plateforme réceptrice sur laquelle est disposée une cage avec l'animal. En bas à droite, le système d'acquisition convertit le signal en numérique pour l'analyse de l'ECG sur ECG auto.

Enregistrement d'ECG de cœur isolé en système Langendorff

Prélèvement du cœur

Le prélèvement du cœur se fait sous anesthésie générale et le protocole utilisé, pour toute expérimentation *ex vivo* ou *in vitro*, respecte les règles d'éthique concernant la condition animale en limitant l'atteinte à une simple piqure d'aiguille en intrapéritonéal (IP).

Solutions injectées en intrapéritonéal

Solutions préparées de 10 ml conservées à 4 °C :

- Solution de kétamine contenant 1 ml Kétamine (1000u.i/ml, Imalgène[®], 500, Merial, France), 0.5 ml de Xylazine (20 mg/25ml, Rompun[®] 2 %, Bayer, France) et 8.5 ml de solution physiologique (NaCl).
- Solution d'Héparine contenant 1 ml d'Héparine (5000 u.i/ml, Choay[®], Sanofi-Aventis, France) et 9 ml de solution physiologique.
- Solution de Pentobarbital contenant 1 ml de Pentobarbital (54.7 mg/ml, Ceva santé animale, France) et 9 ml de solution physiologique.

3 seringues de 1 ml sont mises au bain-marie à 37°C pour la mise à mort de la souris : (1) 0,3 ml de solution de kétamine 100 mg kg⁻¹ (Imalgène, Merial, Bourgelat, France) + Xylazine 10 mg kg⁻¹ (Rompun 2 %, Bayer AG, Leverkusen, Germany), (2) 0,5 ml de solution d'Héparine et (3) 0,3 ml de solution de Pentobarbital / Euthasol.

La première injection anesthésie l'animal ((1) 0.3 ml de kétamine). Quelques minutes plus tard, une seconde injection de 0.5 ml d'Héparine permet de fluidifier le sang et éviter la formation de caillots dans l'organe prélevé. Puis l'animal est euthanasié par une injection de 0.3 ml d'une solution de Pentobarbital ou d'Euthasol.

Le cœur de la souris est prélevé après vérification de l'absence de réflexe végétatif (pincement à la patte) sous anesthésie profonde. L'animal est placé sur le dos et ses 4 membres sont fixés au support de dissection, la partie ventrale de la souris est humidifiée avec de l'alcool pour empêcher la dispersion des poils.

Avec minutie, la peau du thorax est découpée du bas vers le haut afin de dégager entièrement la cage thoracique. Le diaphragme est découpé du centre du sternum vers les extérieurs, puis les côtes sont sectionnées à chaque extrémité extérieure pour pouvoir soulever la cage thoracique. Le thorax dégagé laisse apparaître le cœur et l'appareil respiratoire. Pour extraire le cœur de l'organisme rapidement et de façon à l'endommager le moins possible, la veine cave inférieure est sectionnée dans un premier temps, puis par la suite, l'aorte et les veines pulmonaires sont coupées le plus loin possible du cœur. L'organe est immergé dans un bain de tyrode hépariné (0.5 ml d'héparine dans 50 ml de tyrode) refroidi à 4°C dans une boîte de pétri dont le fond est recouvert de Sylgard (**Solution de tyrode** : 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5 mM, Hepes, 5.5 mM, glucose, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂ (pH ajusté à 7.4 avec NaOH)), conditions permettant de procéder à la canulation de l'aorte.

Montage de cœur isolé sur le système Langendorff et acquisition

La technique d'isolement et de perfusion des cœurs de mammifères a été mise au point par Henry Newell Martin et Oscar Langendorff qui a décrit la technique dans les détails (Langendorff, 1895). Le principe de la technique est d'assurer l'alimentation en oxygène et en nutriments nécessaires au fonctionnement du cœur isolé pendant l'acquisition d'informations sur ses caractéristiques fonctionnelles.

Le cœur isolé soigneusement nettoyé est canulé par l'aorte avec une canule en métal de diamètre adapté (18G) et ligaturé avec du fil de suture. Quelques millilitres de tyrode hépariné sont injectés dans le cœur par la canule pour vider le sang des coronaires et des cavités.

Le cœur canulé est placé sur le système Langendorff (Technologie EMKA) (Figure 49) en prenant soin d'éviter la formation de bulle dans le système de perfusion préalablement rempli de tyrode. Le cœur est perfusé de façon rétrograde (la perfusion est en sens inverse du flux sanguin *in vivo*) avec une solution de Tyrode.

Comme présenté sur la photographie de la Figure 50, les électrodes (Ag-AgCl) d'enregistrement de l'ECG sont placées sur l'épicarde de l'oreillette droite près du NSA et en opposition sur l'apex (dérivation II de l'ECG chez l'homme). L'ensemble d'électrodes est connecté à un amplificateur ECG standard et à un convertisseur analogique/numérique (EMKA Technologies, France). Le signal est numérisé avec une fréquence d'échantillonnage de 1 KHz.

Le cœur est stabilisé 15 minutes avant le début de l'enregistrement. Les paramètres de l'activité cardiaque sont enregistrés en continu par un système informatique dédié à l'acquisition avec le logiciel IOX 2.9.5.43 (EMKA Technologies, France).

Le cœur isolé hors de l'organisme est très sensible aux variations de température et doit être maintenu à 37 °C. La température est régulée grâce à un système de chauffage (double cuve chauffante) et contrôlée en permanence par une sonde thermométrique (Thermalert TH-5 couplé à une sonde RET-4 (Phymep, USA)) placée à la surface du cœur.

Le contrôleur flux-pression contrôle la vitesse de la pompe péristaltique et permet de perfuser le cœur à pression constante (70 mmHg). Le flux est régulé par la pression cardiaque qui est mesurée par un capteur de pression dans le système. Le flux varie entre 2 ml et 5 ml/min en fonction de sa taille et de son état.

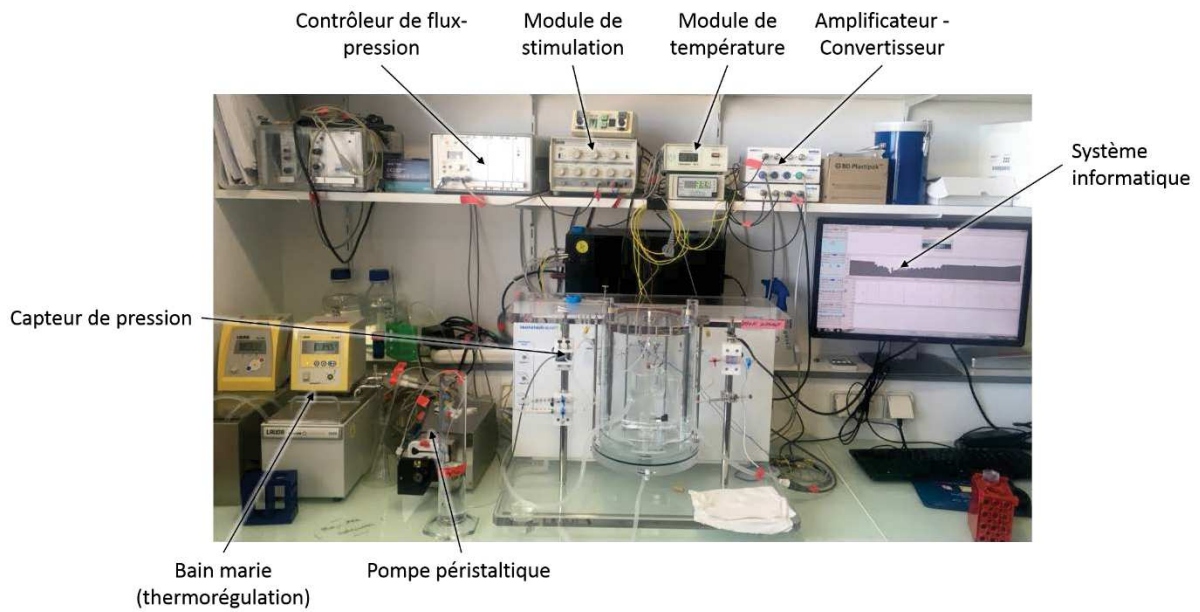


Figure 49 : Photographie du système Langendorff EMKA.

Analyse des ECG *ex vivo*

Les paramètres ECG enregistrés *ex vivo* sont analysés avec le logiciel d'ECG auto v3.3.3.8 (EMKA Technologies, France).

Ce logiciel détecte les pics R des complexes QRS, calcule la moyenne des intervalles RR pour obtenir la valeur de la fréquence cardiaque.

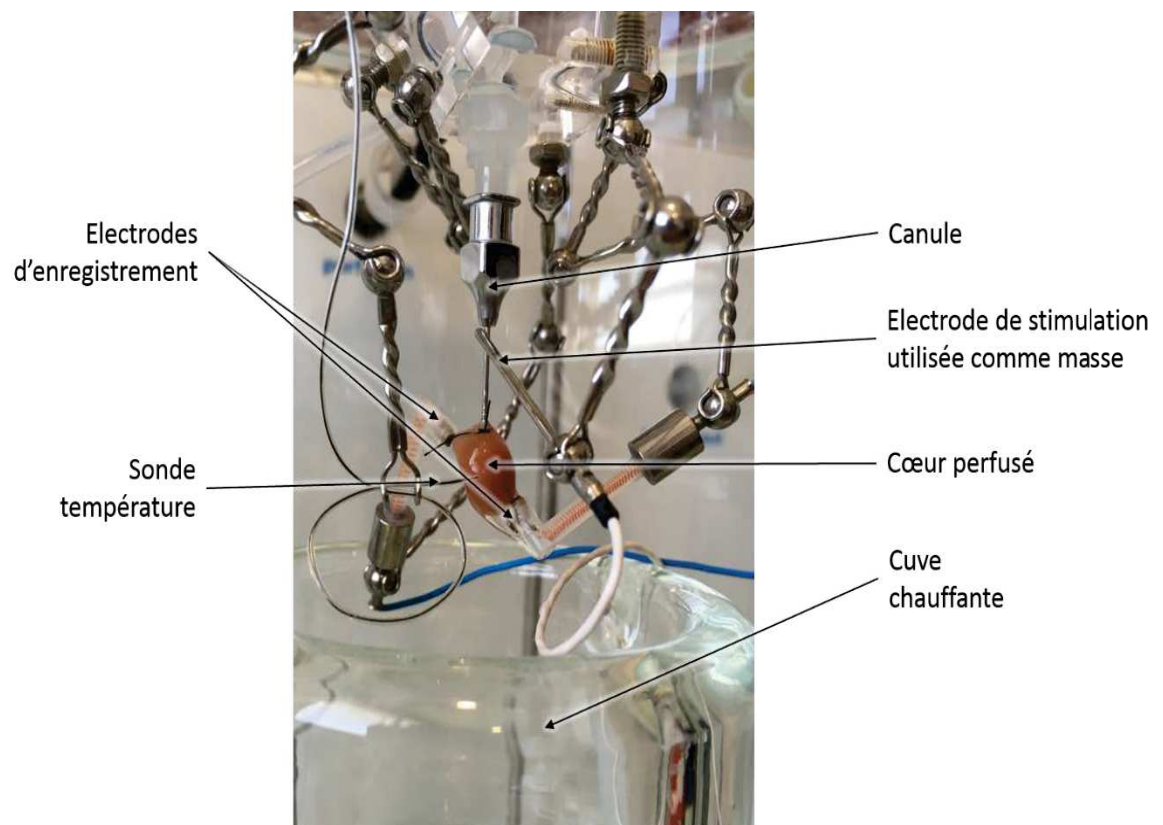


Figure 50 : Photographie d'un cœur perfusé sur le système Langendorff.

Cartographie optique du nœud sinusal

Préparation du tissu sinusal isolé

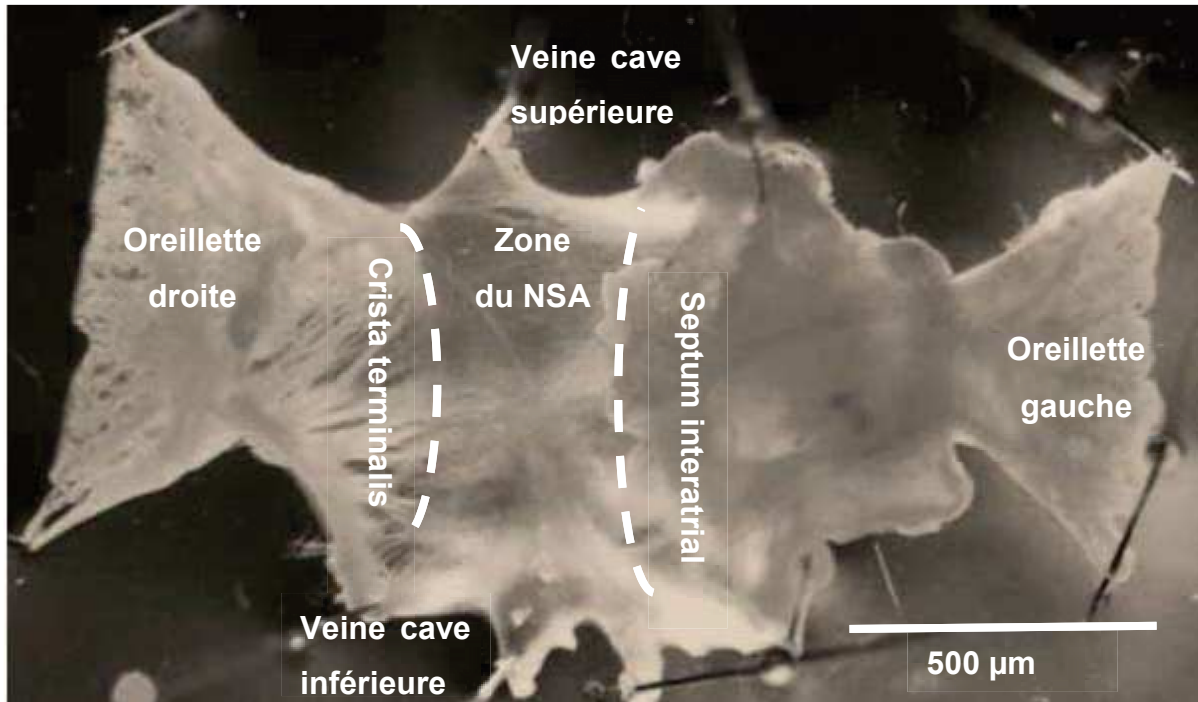


Figure 51 : Photographie de la préparation tissulaire des oreillettes et du NSA épinglée sur une couche de Sylgard. Modifiée d'après Mangoni et al., 2018.

L'expérience est réalisée sous loupe binoculaire. Le cœur est placé dans une boîte de pétri contenant une solution de tyrode héparinée à température ambiante. La masse ventriculaire est épinglée sur du Sylgard qui recouvre le fond de la boîte pour fixer l'organe et permettre de séparer les oreillettes des ventricules sans manipuler la partie atriale. Une première incision est faite entre oreillettes et ventricules au niveau de l'artère coronaire de la face dorsale. Une perfusion de tyrode directement dans les ventricules permet de rincer le sang dans les cavités et les coronaires. Puis la partie auriculaire est totalement séparée des ventricules par un découpage circulaire entre ces deux parties. Le côté péricardique du tissu auriculaire est placé face au Sylgard, l'oreillette droite est située à gauche de l'expérimentateur. Les veines caves supérieure et inférieure sont découpées sur leur longueur afin d'obtenir un tissu sinusal plus aplati entre la CT et le septum interatrial. La préparation incluant les oreillettes droite et gauche est ensuite solidement fixée sur le Sylgard pour une bonne stabilité lors de l'expérimentation (Figure 51).

Traitement du tissu sinusal isolé par un indicateur de voltage

Afin d'analyser les variations de voltage du tissu sinusal, la préparation tissulaire est immergée dans un bain contenant du Tyrode et du **Di-4ANEPS** (5 μ M préparé dans du DMSO; Interchim[®], France), marqueur sensible au voltage pendant au minimum 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante (20–22 °C). Pour maintenir une bonne oxygénation du tissu et un marquage uniforme, la préparation immergée dans sa chambre optique est placée sur une plateforme d'agitation pendant le chargement. Après cette étape, le tissu est rincé avec du tyrode 3 fois pour éliminer l'excédent de marqueur et limiter le bruit de fond pendant l'acquisition.

Acquisition de la fluorescence du tissu sinusal isolé

Pendant l'expérimentation, la préparation tissulaire est placée dans une chambrette chauffante à 37 °C et perfusée environ 15 minutes avec du tyrode contenant de la Blebbistatine (1,5-5 μ M, Tocris Bioscience) préchauffé à 37 °C. La Blebbistatine inhibe la contraction myocardique et évite tout mouvement du tissu pendant les enregistrements pouvant générer des artefacts. Une fois l'incubation terminée, la cartographie optique du voltage peut être réalisée grâce au système d'acquisition MiCAM Ultima-L (SciMedia[®], USA) et d'une caméra (100 × 100 pixels CMOS sensor 10 × 10 mm « complementary metal oxide semiconductor ». Brainvision[®], Japon) complétée d'un obturateur (SciMedia[®], USA). Une lampe halogène de 150-W est utilisée comme source d'excitation du marqueur de voltage (SciMedia[®], USA).

Cet équipement permet une acquisition d'image à haute fréquence de l'activité fluorescente du tissu. La caméra est montée sur un microscope photonique THT avec un assemblage d'objectifs ×2 et ×1,6 pour obtenir un champ d'image de 12,5 mm × 12,5 mm. Elle est associée à un ensemble de filtre d'excitation à 531/50 nm, d'un miroir dichroïque 580 nm et d'un filtre d'émission d'une longueur de 580 nm. Les enregistrements ont une durée maximale de 32,768 secondes (soit 16 384 images à 2 ms d'intervalle) afin d'éviter un effet photo-toxique du marqueur.

Analyse de l'activité électrophysiologique du nœud sinusal

Les cartographies optiques de tissus sont analysées *via* le logiciel développé par le même constructeur que la caméra, « *BV Ana Analysis Software* » (Brainvision, Japon). Ce logiciel nous permet de relever l'activité enregistrée sur 1 pixel et d'obtenir des cartes d'activation mettant en évidence la localisation du foyer de dépolarisation et la conduction du signal vers les extrémités des oreillettes (Figure 52 A). Le tracé de l'activité enregistré sur un seul pixel (Figure 52 B) peut être reporté sur le logiciel Clampfit (version 10.6.2.2, Molecular devices Inc.) pour l'analyse de plusieurs paramètres relatifs à la rythmicité (fréquence et variation standard).

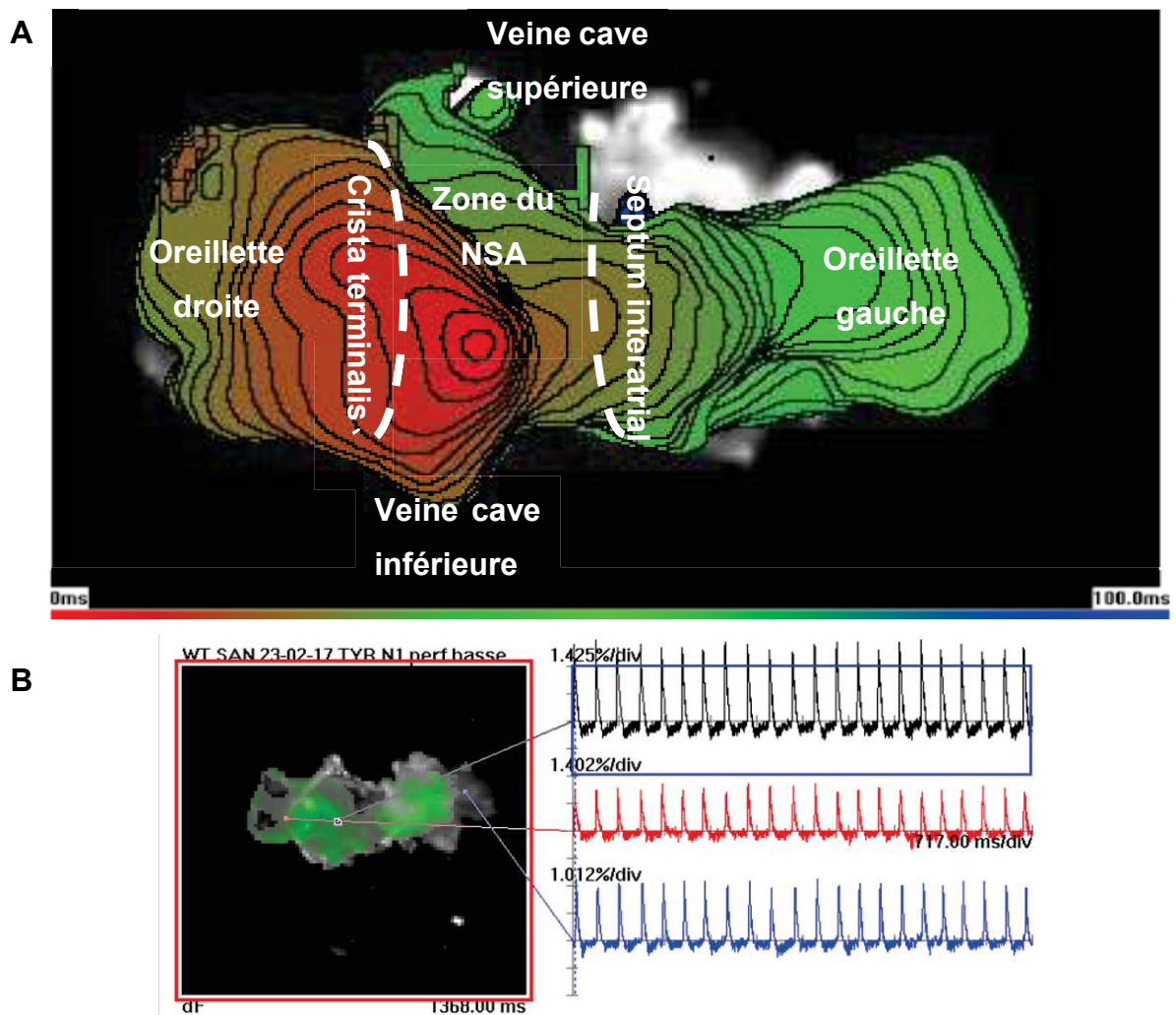


Figure 52 A : Carte d'activation de la préparation du nœud sinusal (souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) mettant en évidence la conduction du signal à partir du foyer de dépolarisation du NSA (rouge) jusqu'aux oreillettes (échelon de couleur : 2 ms). B : Acquisition de l'activité fluorescente enregistrée sur 3 pixels (au niveau du NSA (noir), de l'oreillette droite (rouge) et gauche (bleu) d'un tissu souris WT).

Patch clamp sur cellule isolée du NSA

Préparation de la culture primaire de cellules isolées du nœud sinusal (cNSAs)

A partir de la préparation tissulaire contenant le NSA et les oreillettes, l'oreillette droite est découpée le long de la crista terminalis (CT) située à l'intérieur de l'oreillette. De l'autre côté, l'oreillette gauche est aussi écartée en découpant le long du septum interatrial pour obtenir un tissu contenant le NSA isolé.

Ce tissu, se contractant encore, est incubé dans une succession de 3 tubes contenant 2.5 ml d'une solution dite « low Ca^{2+} » (**Solution « Low Ca^{2+} »** : 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 50 mM taurine, 5.5 mM D-glucose, 1 mg/ml BSA, et 5 mM Hepes-NaOH (ajustée à pH 6.9 avec du NaOH)) à 37°C pendant 4 minutes pour les deux premiers tubes, afin d'éviter les effets toxiques du Ca^{2+} et de préserver l'activité des cNSAs en stoppant l'automatisme.

Le dernier tube de « low Ca^{2+} » contient des enzymes de digestion purifiées : 1.2 mg d'Elastase lyophilisée (1.9 U/ml, Worthington, Lakewood, USA) et Libérase-TH (0.1 mg/ml Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany). Cette phase de digestion enzymatique du tissu peut varier de 10 à 17 minutes. Cette variabilité dépend de la taille de la préparation et de sa proportion en fibre de collagène qui augmente avec l'âge chez l'animal. La digestion du tissu peut être visuellement évaluée, un aspect cotonneux est observé lorsque le tissu est digéré.

Dans une seconde phase, le tissu est transféré successivement dans 4 tubes de 2.5 ml d'une solution « Kraftbrühe » (**Solution « Kraftbrühe » (KB)** : 70 mM L-glutamic acid, 20 mM KCl, 80 mM KOH, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM taurine, 1 mg/ml BSA, and 10 mM Hepes-KOH (ajusté à pH 7.4 avec du KOH)) pour stopper le processus de digestion (Protocole : 3 X 2 min puis 1 X 4 min). Afin d'obtenir des cNSAs isolées, le tissu fragilisé par la digestion enzymatique est dissocié mécaniquement grâce à une agitation lente et délicate à l'aide d'une pipette pasteur en verre associée à une petite pompe manuelle. La dissociation est une phase critique du protocole qui demande beaucoup d'application pour ne pas créer de bulles dans le bain des cellules. Suite à cette phase de dissociation, les cNSAs sont isolées les unes des autres.

Pour stabiliser la préparation cellulaire après les phases de digestion et de dissociation, il s'en suit un processus de réadaptation progressif avec la réintroduction du Ca^{2+} dans le milieu

cellulaire. A des intervalles de temps de 4 minutes minimum, 75 μ l puis 160 μ l d'une solution de réadaptation N°1 (**Solution de réadaptation** : 10 mM de NaCl, 1.8 mM de CaCl₂) sont ajoutés. Puis 390 μ L et 2X 625 μ l d'une solution tampon de Tyrode et de BSA (« Bovine Serum Albumine » 1 mg/ml). Plus l'intervalle de temps entre chaque phase de la réadaptation est long, plus elle est progressive. Or, elle ne doit pas durer trop longtemps car les cNSAs ont une durée de vie limitée de quelques heures. Un temps de repos de 4 minutes est nécessaire avant le dépôt de la culture cellulaire sur des boites à fond en verre. Le tissu est légèrement agité de nouveau avant le dépôt pour obtenir une concentration homogène de cNSAs. Avant le début de l'expérimentation, 40 minutes sont nécessaires pour que les cNSAs se déposent et adhèrent au fond de la boite.

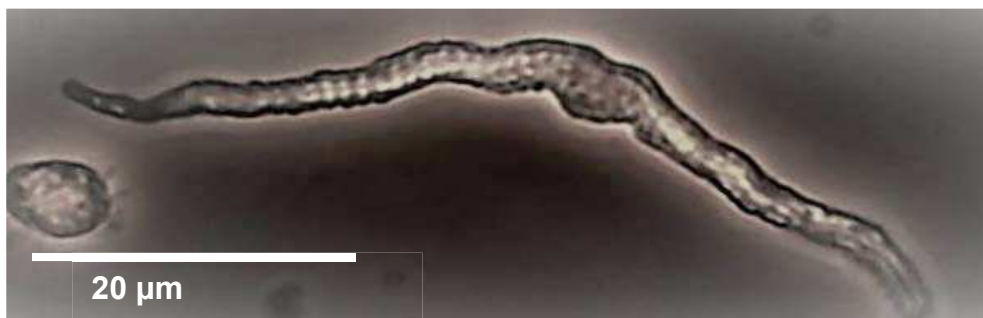


Figure 53 : Photographie d'une cNSA isolée. D'après Mangoni et al., 2018.

Acquisition en « Current clamp » configuration patch perforé

La technique de *patch clamp* nous permet d'enregistrer la différence de potentiel à la surface membranaire des cNSAs en configuration « *current clamp* ». Les pipettes en verre de borosilicate creuses avec filament (Sutter instrument CO., USA) sont étirées pour obtenir un diamètre de 5 à 7 μ m à la pointe (résistance de 3 à 5 M Ω). Elles sont remplies d'un milieu de composition proche de celui du milieu intracellulaire de la cNSA (**contenant** 130.0 mM K⁺-aspartate; 10.0 mM NaCl; 2.0 mM ATP-Na⁺ salt, 6.6 mM créatine phosphate, 0.1 mM GTP-Mg²⁺, 0.04 mM CaCl₂ (pCa = 7.0), et 10.0 mM HEPES-KOH (ajusté à pH 7.2 avec du KOH) additionné de saponine β -escine (30 μ M).

Sous un microscope inversé, l'extrémité de la pipette est accolée à la membrane d'une cNSA grâce à un micromanipulateur et une pression négative est appliquée dans la pipette afin

d'effectuer un contact quasiment imperméable entre la pipette et la cellule (gigaseal, $G\Omega$). Après quelques minutes, la membrane est perforée sans se briser et la résistance d'accès est de plusieurs $G\Omega$. Un couple d'électrodes d'enregistrement dans la pipette et dans le milieu extracellulaire permet l'acquisition de la différence de potentiel à la membrane de la cellule. Le signal traverse un amplificateur Axo clamp 700A (Molecular devices) qui amplifie le signal (Sakmann and Neher 1984).

Le signal est ensuite digitalisé et observé sur le logiciel pClamp (v10.3, Molecular Device Inc.). Les agents pharmacologiques sont diffusés dans le milieu à 37 °C grâce à un stylo de perfusion chauffant (MPRE8, Cell Micro control).

Analyse de l'activité électrophysiologique des cellules du nœud sinusal

L'analyse de l'activité électrophysiologique des cNSAs est réalisée grâce au logiciel Clampfit (version 10.6.2.2, Molecular devices Inc.). Ce logiciel permet d'analyser automatiquement la fréquence des PA et les paramètres relatifs au potentiel de membrane tels que les pentes des différentes phases du potentiel ainsi que le seuil de déclenchement, la durée et l'amplitude des PA (Figure 54).

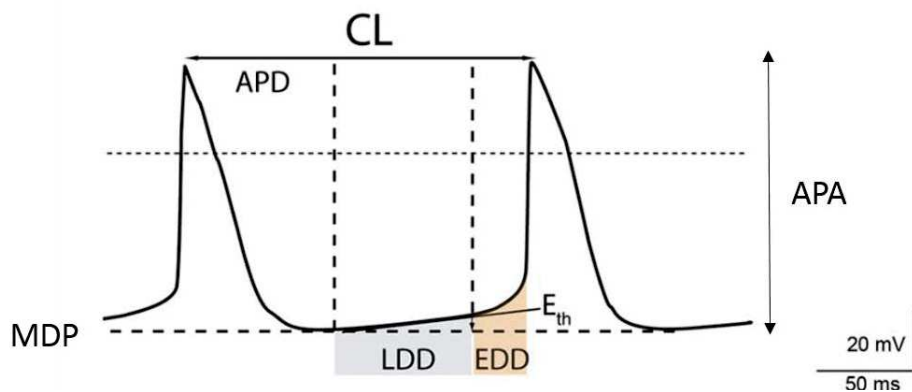


Figure 54 : Schéma de PA de cNSA. MDP : Potentiel maximal de dépolarisation ; APD : Durée du PA ; APA : Amplitude du PA ; LDD : Pente de la phase linéaire de la DD ; EDD : Pente de la phase exponentielle de la DD ; E_{th} : Seuil de déclenchement de PA ; CL : Temps d'un cycle. Modifié d'après Mangoni et al., 2008.

Imagerie calcique en microscopie confocale

Marquage du calcium intracellulaire des cellules du nœud sinusal

L'imagerie calcique en microscopie confocale permet d'étudier la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire. La préparation cellulaire de cNSAs isolées est la même que pour l'expérimentation en *patch clamp*. En revanche, les cellules sont déposées dans des boîtes de type Fluorodish (fond en verre) tapissées de Laminine (Sigma[®], 60 μl de Laminine 1 mg/ml dans 6 à 8 ml de tyrode) pour une fixation solide des cNSAs (quelques centaines de μl de Laminine sont déposées dans les boîtes au minimum 4 h à l'avance). Avant le dépôt des cellules, la solution de Laminine est rincée et remplacée par 100 à 200 μl de milieu de culture des cNSAs. Après une heure, les cellules sont marquées au CAL520 (AAT Bioquest[®], USA. **Solution CAL520** : prendre 0.5 μl de solution stock de CAL520 à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ajouter 0.5 μl d'acide pluronique F-127 (0.13 % ; Invitrogen) et mélanger avec 1 ml de tyrode pour une concentration finale à 0.5 μM). Dans une Fluodish, déposer 100 μl de solution CAL520, laisser environ 30 minutes à l'obscurité et à 25 °C. L'expérimentation en microscopie confocale peut commencer après 3 rinçages du CAL520 avec du tyrode de manière délicate pour ne pas décoller les cellules.

Acquisition en microscopie confocale en configuration « line scan »

L'acquisition a été réalisée à la plateforme MRI (Plateforme Régionale d'Imagerie du Languedoc-Roussillon ; Biocampus). Les cellules marquées sont placées sous un microscope confocal à balayage laser (Zeiss, LSM 780) et les paramètres d'acquisitions se font *via* le logiciel ZEN (de Zeiss aussi). Un laser Argon scanne une partie choisie de la cNSA en configuration « *line scan* » à une vitesse de balayage linéaire de 10000 X 3,78 ms (V6) ou 1,53 ms (V8). La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et l'émission est collectée à >505 nm, avec un objectif à grossissement X63 en immersion à l'huile. Les mouvements de Ca^{2+} intracellulaire dans les cNSAs sont enregistrés avec différents agents pharmacologiques perfusés dans le bain à 37 °C grâce à un stylo de perfusion chauffant (MPRE8, Cell Micro control).

Analyse de la fluorescence des cellules du nœud sinusal

Les images de l'activité calcique sont analysées sur le logiciel ImageJ (NIH). Les images sont, dans un premier temps, corrigées pour réduire le bruit et pouvoir bien compter le nombre de « Ca^{2+} sparks » (LCRs). Ensuite, après avoir obtenu l'intégrale du signal de la fluorescence, l'analyse avec Clampfit (Version 10.6.2.2, Molecular devices) nous permet de mesurer les paramètres relatifs aux transitoires calciques (fréquence, déviation standard et intensité (ratio F/F_0)).

Statistiques

Les évaluations statistiques sont réalisées sur Prism 7 (GraphPad, Inc). Les résultats sont représentés sous leur valeur moyenne +/- SEM (« *standard error of the mean* », erreur type de la moyenne). Les *t*-tests pairs ou impairs, « *One-way* » ou « *Two-way* » ANOVA avec ou sans répétition des mesures sont utilisés de la manière la plus appropriée et spécifiés pour chaque figure. La valeur minimum de * $P \leq 0.05$ est considérée comme significative, puis ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ et **** $P < 0.0001$.

RESULTATS

L'ensemble de mes résultats seront présentés dans une publication actuellement en cours d'écriture et sera soumis à un journal scientifique.

“Concomitant genetic ablation of L-type Ca_v1.3 and T-type Ca_v3.1 channels disrupts heart automaticity.”

M. Baudot^{1,2}, A.G. Torrente^{1,2}, I. Bidaud^{1,2}, L. Fossier^{1,2}, L. Talssi^{1,2}, H.S. Shin³, J. Striessnig⁴, J. Nargeot^{1,2}, S. Barrère-Lemaire^{1,2}, P. Mesirca^{1,2}, M.E. Mangoni^{1,2*}

¹Institut de Génomique Fonctionnelle, Département de Physiologie, Université de Montpellier, CNRS, Inserm.

²LabEx ICST, Montpellier, France.

³Korea institute of science and technology, Seoul, South Korea.

⁴Institute of Pharmacy, Innsbruck, Austria.

*Correspondence to: Matteo E. Mangoni

Institute of Functional Genomics

CNRS UMR 5203, Inserm U 1191

141, rue de la cardonille

34097 Montpellier, France

tel. +33 (0)4 34 35 92 46

fax. +33 (0)4 67 54 24 32

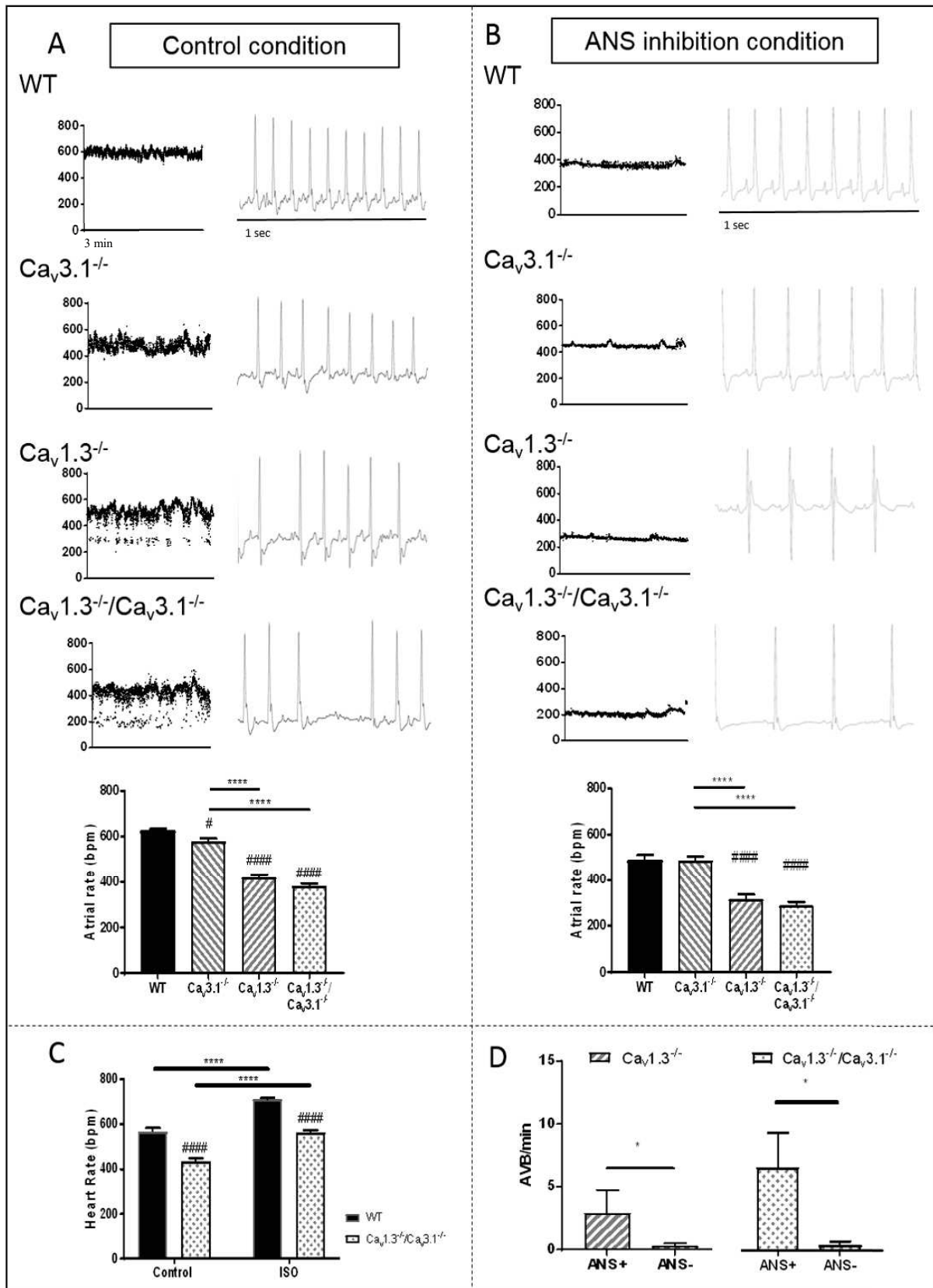
e-mail: matteo.mangoni@igf.cnrs.fr

Abstract

Heart automaticity is generated in the sino-atrial node (SAN) by ion channels of the plasma membrane and intracellular ryanodine receptor (RyR) -dependent Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR). SAN cells express voltage-gated L-type $\text{Ca}_v1.3$ and T-type $\text{Ca}_v3.1$ Ca^{2+} (Ca_v) channels in addition to L-type $\text{Ca}_v1.2$ channels of the working myocardium. We used mutant mice carrying individual or concomitant genetic ablation of $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v3.1$ to study the role of these channels in heart automaticity. Ca_v ablation additively reduced in vivo HR in mice: $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-7.6%, n=11), $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (-24.4%, n=8), $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-35%, n=11). ECG recordings of intact $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ hearts showed atrioventricular rhythm dissociation and predominant junctional, rather than SAN driven rhythmicity. Disruption of primary automaticity in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ hearts was observed by optical mapping (OM) of the pacemaker impulse as a shift of the leading pacemaker sites outside the SAN area. We also investigated the role of hyperpolarization-activated f-(HCN) channels, TTX-sensitive Na^+ (Na_v) channels and RyR-dependent Ca^{2+} release in residual pacemaker activity of mutant mice. Concomitant pharmacologic inhibition of f-HCN and TTX-sensitive Na_v channels slowed atrial automaticity in wild-type (-48%, n=7) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-37%, n=7), while arrested it in 4/6 of $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$, 3/6 of $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$. When present, residual pacemaking was reduced by 82%. In isolated $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN pacemaker cells automaticity was arrested in 5/9 cells tested, or was reduced by 80% in 4/9 cells. We conclude that concomitant ablation of $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v3.1$ Ca^{2+} channels disrupts normal heart automaticity. In addition, RyR-dependent Ca^{2+} release cannot sustain automaticity following concomitant targeting of $\text{Ca}_v1.3$ and f-HCN channels.

Keywords: Sino-atrial node, calcium channels, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v3.1$, diastolic depolarization, pacemaker mechanism.

1. L'ablation génétique de $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ altère l'automatisme cardiaque.



Résultat 1 A : Graphiques à points de l'intervalle RR (gauche) et ECGs (droite) de tous les génotypes en condition contrôle. En dessous, l'histogramme montre la fréquence atriale correspondant à l'intervalle PP. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. **B :** Même représentation de l'activité cardiaque après l'injection IP d'Atropine (0.5 mg/kg) + Propranolol (5 mg/kg) qui inhibe le système nerveux autonome (ANS). WT N=10, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=12, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=8. Test: One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons. **C :** Rythme cardiaque avant et après injection d'ISO 0.1 mg/kg. WT N=10, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=11. Test: Two way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test. **D :** Nombre d'AVB par minute en condition contrôle et après l'injection d'Atropine + Propranolol. $Ca_v1.3^{-/-}$ N=6, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. Unpaired t test. # : Par comparaison avec WT.

Les ECG enregistrés en télémétrie *in vivo* révèlent une bradycardie sinusale chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ (~10 %), $Ca_v1.3^{-/-}$ (~30 %) et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (~35 %) par comparaison avec les souris WT (1 A). L'ablation de $Ca_v1.3$ provoque des défauts de conduction marqués par des AVBs qui sont plus nombreux avec l'ablation additionnelle de $Ca_v3.1$ (1 D). L'ablation de $Ca_v1.3$ provoque également une instabilité de la fréquence cardiaque qui fluctue entre tachycardie et bradycardie. Par comparaison avec les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, la double ablation a un effet additif sur la fréquence cardiaque (RR) des souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mais pas sur la fréquence atriale (PP). (Résultat suppl. 8)

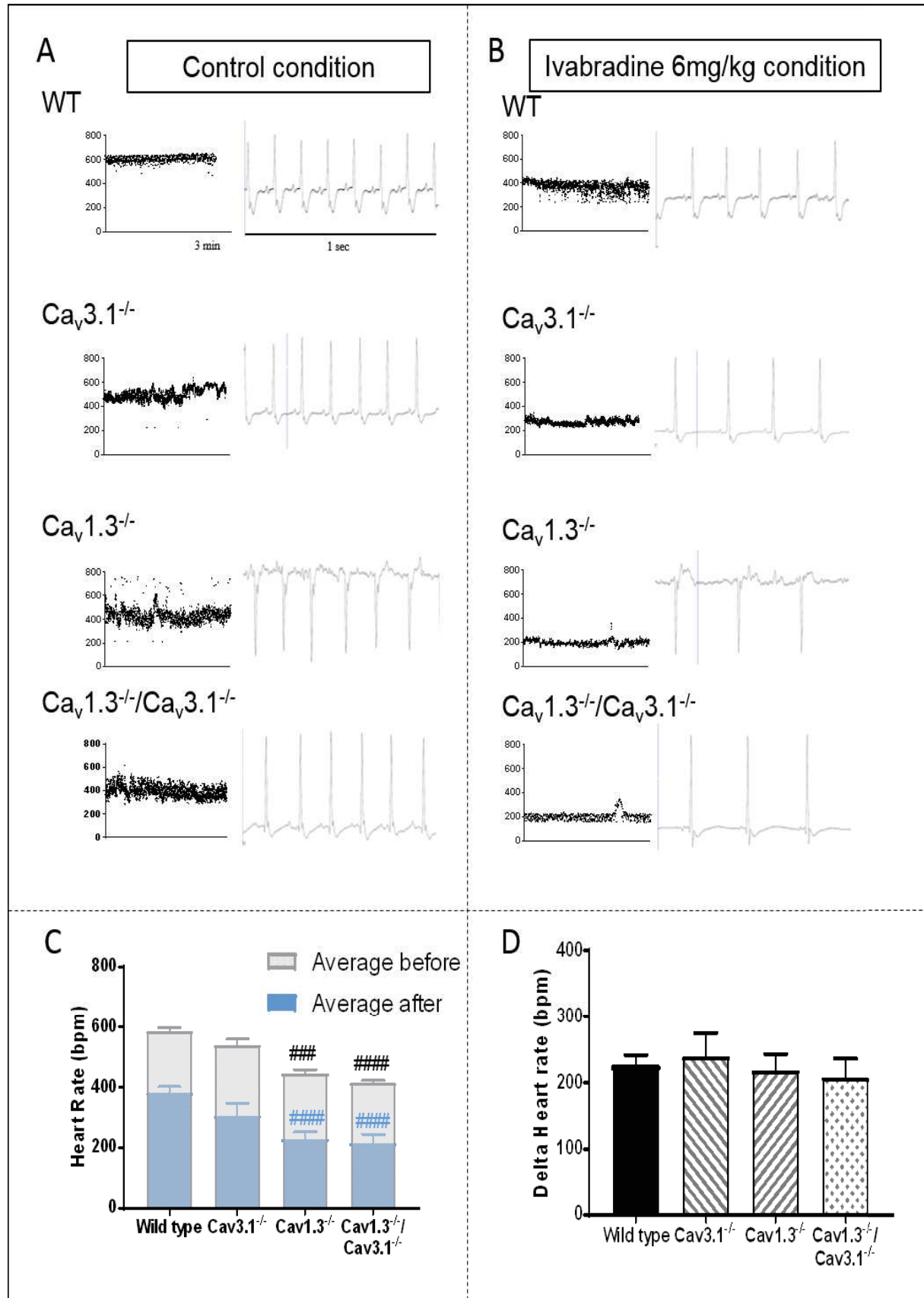
Cette différence entre la fréquence atriale et ventriculaire pourrait s'expliquer par les phénomènes d'AVBs plus nombreux chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ par rapport aux autres génotypes. (Résultats aussi observés dans Marger et al., 2011).

L'inhibition du tonus du SNA par l'injection d'Atropine (0.5 mg/kg) + Propranolol (5 mg/kg) (A+P) réduit les fréquences atriales, et ventriculaire (résultat suppl. 8) ainsi que le nombre d'AVBs chez tous les génotypes (1 B, D). La diminution de la fréquence cardiaque est accompagnée par une stabilisation du rythme qui reste toutefois plus instable chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (résultat suppl. 8).

Les exemples de graphiques à points et d'ECGs montrent la variabilité du rythme cardiaque en fonction du temps et l'injection d'A+P stabilise le rythme cardiaque des différents génotypes. Une disparition quasi-totale du nombre d'AVB (1 D) accompagne la stabilisation de la fréquence cardiaque sous l'effet d'A+P (Résultat suppl. 8).

La double ablation des canaux calciques provoque un important dysfonctionnement de l'automatisme cardiaque. Cependant, l'injection de l'agoniste adrénergique, l'Isoprénaline (ISO, 0.1 mg/kg), stimule toujours l'activité cardiaque chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (1 C).

2. Effet de l'ivabradine sur l'activité cardiaque de $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$.



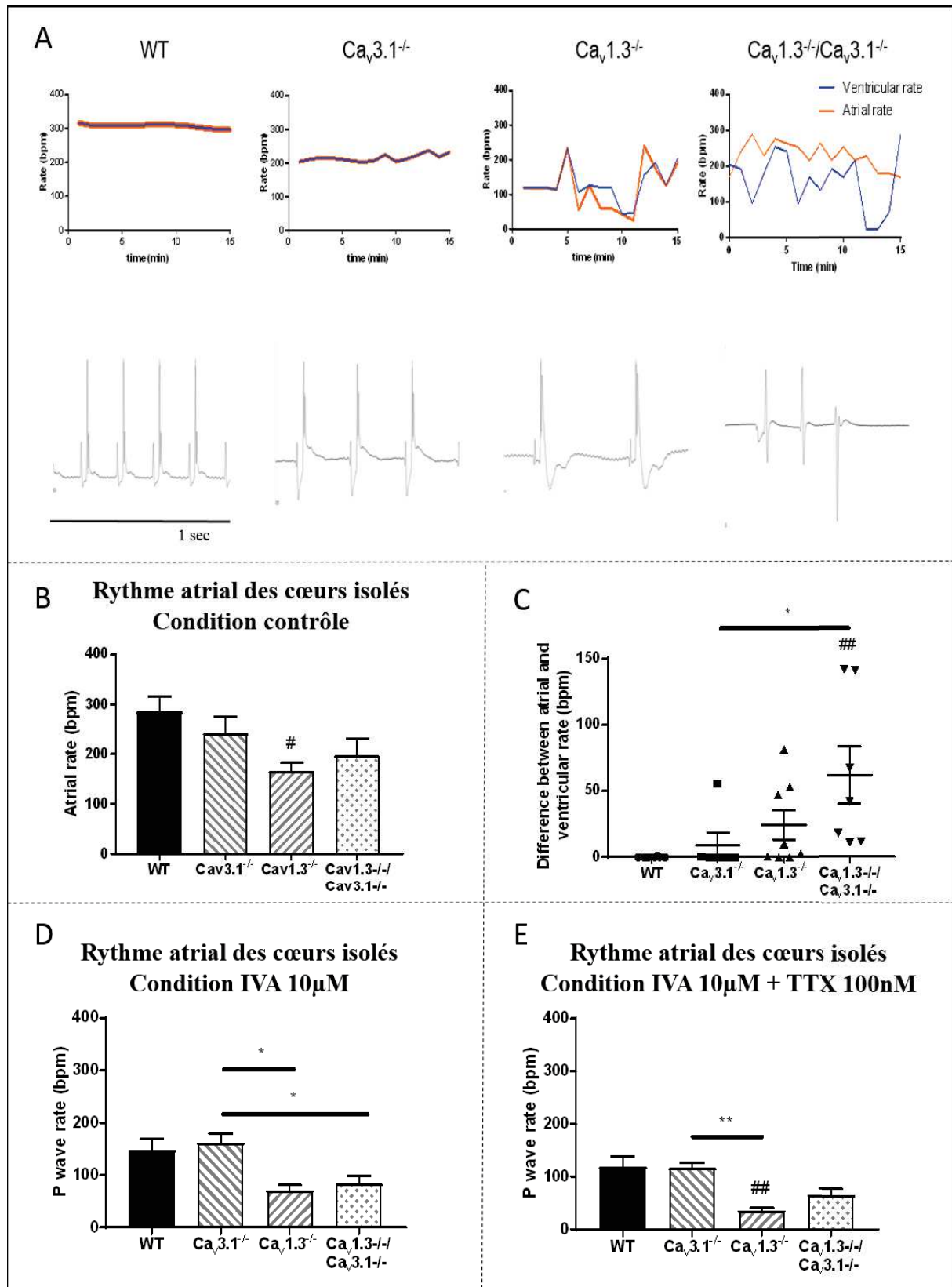
Résultat 2 A : Graphiques à points et ECGs avant et (**B :**) après injection d'IVA 6 mg/kg. **C :** Fréquence cardiaque moyenne avant (gris) et après (bleu) injection d'IVA dans les différents génotypes. *WT* N=10, *Ca_v3.1^{-/-}* N=5, *Ca_v1.3^{-/-}* N=8, *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}* N=10. **D :** Effet relatif de l'injection de l'IVA sur la fréquence cardiaque en bpm sur tous les génotypes. Test: One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. # : Par comparaison avec *WT*.

In vivo, l'injection IP d'une dose de 6 mg/kg d'IVA inhibe les canaux HCN responsables du courant I_f de manière complète et sélective. L'inhibition d' I_f stabilise et diminue la fréquence cardiaque d'environ 210 bpm chez tous les génotypes (2 B, D). Lorsque *Ca_v1.3* est muté et qu' I_f est inhibé, la fréquence cardiaque atteint un seuil minimum moyen de 200 bpm (2 C).

Par rapport à la fréquence de base d'environ 600 bpm des souris *WT*, l'ablation concomitante de *Ca_v1.3* et *Ca_v3.1* réduit d'un tiers la fréquence cardiaque. Ensuite, l'inhibition d' I_f la réduit d'un deuxième tiers (2 D). La fréquence cardiaque résiduelle d'environ 200 bpm est faible mais viable.

L'origine de cette fréquence de 200 bpm peut être attribuée à d'autres éléments du *pacemaker* tels que les canaux sodiques *Na_v1.1* responsables du courant I_{Na} TTX-sensitive impliqué dans la DD dans le centre du NSA. L'exploration sur l'origine de cette activité cardiaque résiduelle est limitée *in vivo*.

3. L'activité cardiaque de $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ ex vivo est désynchronisée.



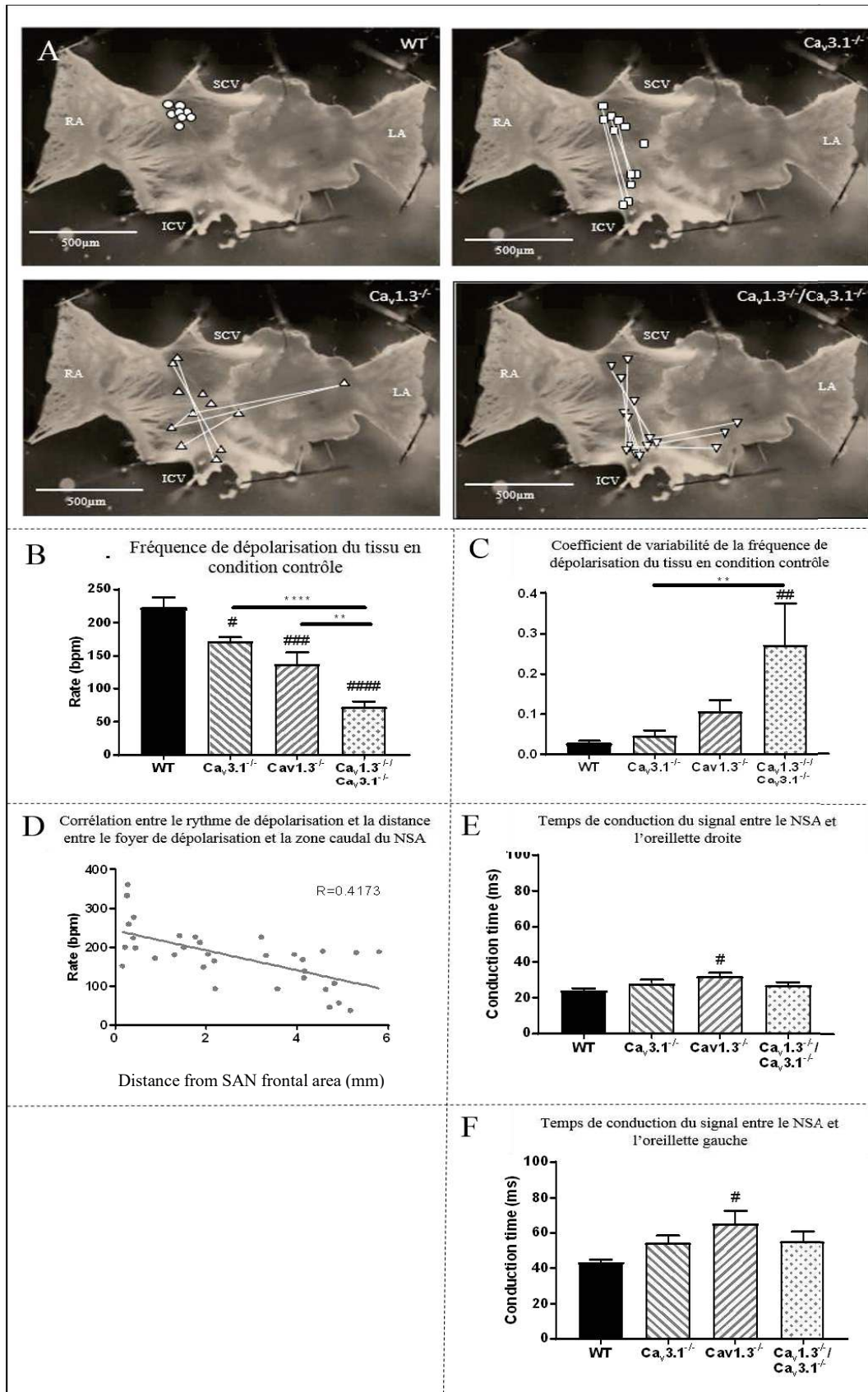
Résultat 3 A : Graphiques à points des fréquences atriales en bleu et ventriculaires en orange enregistrés sur un même cœur avec l'ECG correspondant en dessous. **B, D et E :** Fréquences atriales des cœurs isolés en condition contrôle, sous perfusion d'IVA 10 μ M (+10 min) et d'IVA 10 μ M + TTX 100 nM (+10 min). **C :** Graphique de la variabilité moyenne entre les fréquences atriales et ventriculaires enregistrées sur les cœurs isolés en condition contrôle. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=6, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. Test : One way ANOVA pour A, D, E. Kurskal-Wallis non parametric, Dunn's multiple comparisons test pour C. # : Par comparaison avec WT.

Le montage du cœur isolé sur le système de perfusion Langendorff et l'enregistrement d'ECG *ex vivo* apportent un nouvel angle d'observation et de nouvelles ouvertures pour l'étude de l'activité cardiaque des souris mutantes. Cette technique est fiable puisque les ECGs des cœurs WT montrent une fréquence normale et régulière. Elle permet également d'utiliser plusieurs agents pharmacologiques successivement.

Premièrement, la fréquence atriale *ex vivo* se révèle inférieure et plus instable que celle observée *in vivo* chez les génotypes mutants. Cependant, la réduction des fréquences atriales due aux ablations génétiques reste en accord avec celles observées *in vivo* dans les génotypes (WT > $Ca_v3.1^{-/-}$ > $Ca_v1.3^{-/-}$ ~ $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, 3 B). Les défauts de conduction atrioventriculaire sont accentués dans les génotypes qui en présentaient déjà *in vivo*. En effet, les ECGs de tous les cœurs isolés $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ perfusés sur le système Langendorff montrent une dissociation complète entre les activités atriale et ventriculaire (rythme et variation, 3 C). Ce type d'évènement correspond à un stade sévère d'AVB nommé AVB de troisième degré (AVB III) et peut aussi survenir *in vivo* chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les phénomènes d'AVB III traduisent un arrêt complet de la fonction de conduction du NAV. De plus, l'ablation concomitante de ces canaux calciques cause d'autres évènements arythmiques tels que des extrasystoles ventriculaires (ESV) et des rythmes d'échappements (résultat suppl. 14). Ces observations montrent une altération globale du cœur $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les oreillettes sont guidées par l'activité faible et arythmique du NSA alors qu'une autre partie rythmogène guide l'activité ventriculaire (e.g. His, PF) de manière dysfonctionnelle également.

Deuxièmement, le système Langendorff permet de perfuser les inhibiteurs spécifiques d' I_f et d' $I_{Na-TTX-sensitive}$ sur le cœur. L'inhibition successive d' I_f et d' $I_{Na-TTX-sensitive}$ par l'IVA (10 μ M) puis une concentration additionnelle de TTX (100 nM) diminuent progressivement la fréquence atriale de tous les génotypes (3 D, E). Il est difficile de décrire l'origine de l'activité cardiaque résiduelle des cœurs $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ sous l'effet d'IVA + TTX.

4. Les ablations génétiques désynchronisent l'activité du nœud sinusal.



Résultat 4 A : Photographie d'une préparation du tissu sinusal isolé en condition contrôlée. Cette image sert de référence pour localiser les différents foyers de dépolarisation sur les différents génotypes. Chaque point est le foyer de dépolarisation sur un tissu. Les foyers de dépolarisation liés par une ligne montrent qu'il y a plusieurs foyers sur un même tissu. **B :** Fréquences de dépolarisation et (**C :**) coefficients de variabilité des fréquences de dépolarisation. *WT* N=8, *Ca_v3.1^{-/-}* N=8, *Ca_v1.3^{-/-}* N=7, *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}* N=7. One way ANOVA. **D :** Régression linéaire entre la fréquence de dépolarisation et l'éloignement du foyer de dépolarisation vis à vis de la zone frontale du NSA où est regroupé l'activité dans les tissus *WT*. **E :** Temps de conduction entre le début de la dépolarisation du foyer et la dépolarisation complète de l'oreillette droite (RA) et gauche (**F :**, LA). # : Par comparaison avec *WT*.

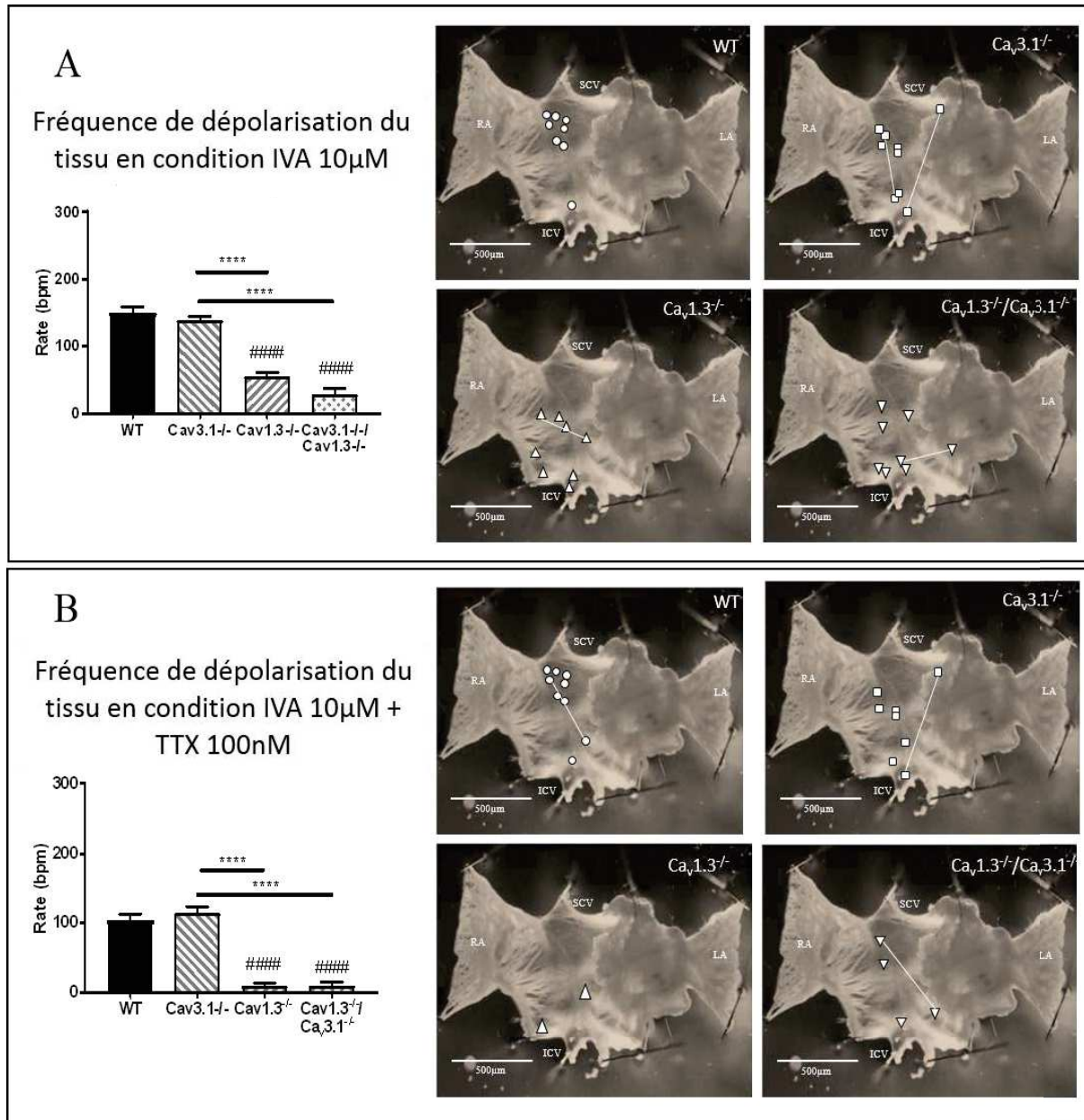
Suite aux observations *ex vivo* sur les cœurs isolés présentant de nombreuses dysfonctions, il était nécessaire d'utiliser une nouvelle approche pour l'observation de l'activité intrinsèque du NSA. Le NSA est isolé des autres centres rythmogènes dans une préparation tissulaire standard (4 A). Grâce à un marqueur du voltage en cartographie optique, on localise les foyers de dépolarisation d'où émerge l'activité *pacemaker* et on mesure le temps de conduction de la vague de dépolarisation à travers le tissu. Le temps de conduction du signal à travers le tissu est plus long dans les tissus *Ca_v1.3^{-/-}* en comparaison avec les tissus *WT* (4 E, F).

Dans les tissus *WT*, les foyers de dépolarisation se concentrent à la région frontale du NSA, proche de la veine cave supérieure (SCV) (4 A, *WT*). Les ablations des canaux calciques provoquent le déplacement des foyers de dépolarisation vers la partie caudale du NSA ainsi qu'une multiplication des foyers de dépolarisation dans certains tissus. L'éloignement du foyer de dépolarisation vers la partie caudale est corrélé avec une diminution de la fréquence de dépolarisation (4 D). Ce phénomène a déjà été observé sous l'effet de l'ACh (Glukhov, Fedorov et al. 2010).

L'ablation de *Ca_v1.3* peut provoquer l'apparition de foyers de dépolarisation ectopique à la zone du NSA. (4 A, *Ca_v1.3^{-/-}* et *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}*). On observe notamment des foyers dans le septum interatrial, proche de l'oreillette gauche.

Le NSA sans *Ca_v1.3* et *Ca_v3.1* est fortement altéré. L'effet des ablations sur la fréquence de dépolarisation du tissu sinusal est additif. En effet, par rapport au *WT*, la fréquence de dépolarisation est réduite de 23 % chez les génotypes simple mutant *Ca_v3.1^{-/-}*, de 39 % chez *Ca_v1.3^{-/-}* et de 68 % chez le *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}* (4 B). Egalement, la fréquence de dépolarisation est fortement arythmique vis-à-vis des autres génotypes (4 C).

5. L'addition des inhibitions d' I_f , d' I_{Na} TTX-sensitive et de l'ablation de $Ca_v1.3$ supprime l'activité spontanée du nœud sinusal.



Résultat 5 A : Photographie de la préparation tissulaire du tissu sinusal isolé standard. Les foyers de dépolarisation sont marqués après la perfusion d'IVA 10 μ M pendant 10 min. L'histogramme associé montre la fréquence de dépolarisation des différents génotypes après la perfusion d'IVA 10 μ M. **B :** La même représentation est réalisée sous perfusion d'IVA 10 μ M + TTX 100 nM. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. One-way ANOVA. #: Par comparaison avec WT.

Les mêmes conditions d'inhibitions pharmacologiques d' I_f et d' I_{Na} TTX-sensitive effectuées sur le cœur isolé sont reproduites sur le NSA isolé. Ceci dans le but d'étudier la contribution des canaux HCN et $Na_v1.1$ dans la fréquence, la conduction et la localisation des foyers de dépolarisation au sein du NSA.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés sur le cœur isolé : la perfusion d'IVA (10 μ M) sur les tissus isolés ralentit la fréquence de l'activité spontanée (5 A). L'IVA ne modifie pas significativement le coefficient de variabilité de la fréquence de dépolarisation sauf dans les tissus $Ca_v1.3^{-/-}$ (résultat suppl. 9). La fréquence de dépolarisation des NSA *WT* et $Ca_v3.1^{-/-}$ est maintenue autour de 150 bpm.

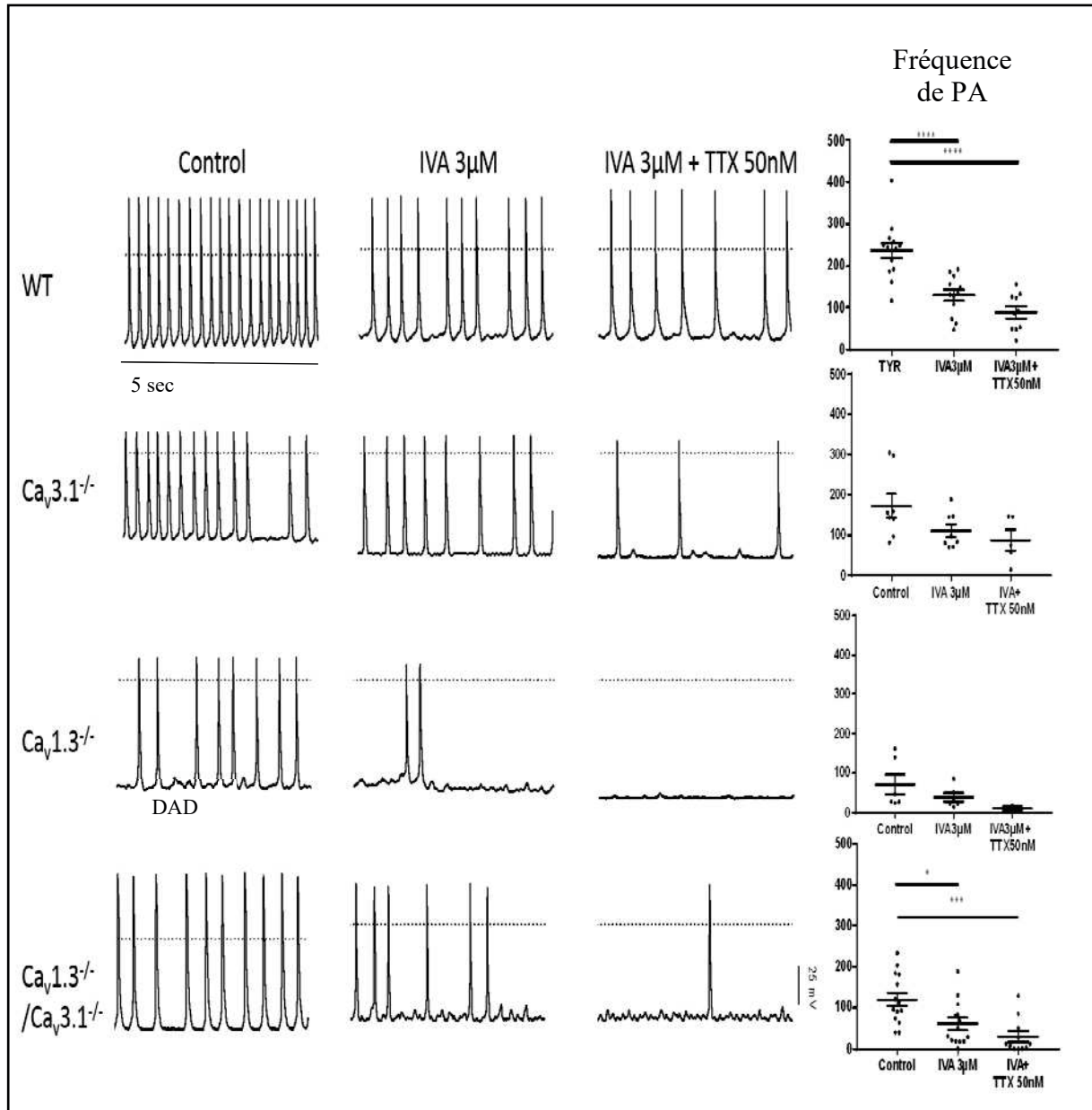
Suite à la perfusion d'IVA, certains foyers de dépolarisation sont modifiés. 1 tissu *WT* sur 8 montre un déplacement de son foyer de dépolarisation vers la partie caudale. Un foyer ectopique apparaît dans 1 tissu $Ca_v3.1^{-/-}$ sur 8. L'inhibition d' I_f réduit le phénomène de multiplication de foyer au sein d'un même tissu (résultat suppl. 10).

Dans la condition suivante, une faible dose de TTX (100 nM) est ajoutée à la concentration initiale d'IVA 10 μ M (5 B) pour inhiber I_{Na-TTX} sensitive. Parmi les tissus *WT* dont la fréquence est d'environ 100 bpm dans cette condition, 1 tissu sur 8 développe un nouveau foyer de dépolarisation ectopique. La fréquence de dépolarisation spontanée est réduite à 0 dans la majorité des tissus $Ca_v1.3^{-/-}$ (5/7) et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (4/7). Ces tissus silencieux ne peuvent donc plus générer une activité spontanée sans les canaux ioniques $Ca_v1.3$, HCN et $Na_v1.1$ impliqués dans la DD.

Les tissus de ces génotypes ayant encore une activité résiduelle dans cette condition ont une fréquence très basse d'une dizaine de bpm et très arythmique (résultat suppl. 9). Cette activité peut provenir de foyers de dépolarisation situés dans la partie frontale ou caudale du NSA, ou bien être ectopique au NSA.

En revanche, les perfusions d'IVA et d'IVA+ TTX n'ont pas d'effet sur le temps de conduction du signal à travers les tissus des différents génotypes. Ce qui montre que les canaux HCN et $Na_v1.1$ ne sont pas impliqués dans la conduction mais simplement dans la génération de l'activité du NSA.

6. Les inhibitions concomitantes d'I_f et d'I_{Na} TTX-sensitive et l'ablation de Ca_v1.3 suppriment l'activité spontanée dans les cellules du nœud sinusal.



Résultat 6 : Exemples d'enregistrement de PA de cNSA des différents génotypes et dans les différentes conditions d'inhibitions, effectués en patch clamp. Les concentrations de TTX et d'IVA sont diminuées par rapport aux expériences ex vivo car les cNSAs isolées sont plus sensibles que les tissus et les cœurs isolés. Les figures à droite montrent les fréquences de PA mesurées dans les cNSAs dans tous les génotypes en condition contrôle, IVA 3 μM et IVA 3μM + TTX 50 nM. En condition contrôle: WT n=14; Ca_v3.1^{-/-} n=8; Ca_v1.3^{-/-} n=6; Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} n= 14.

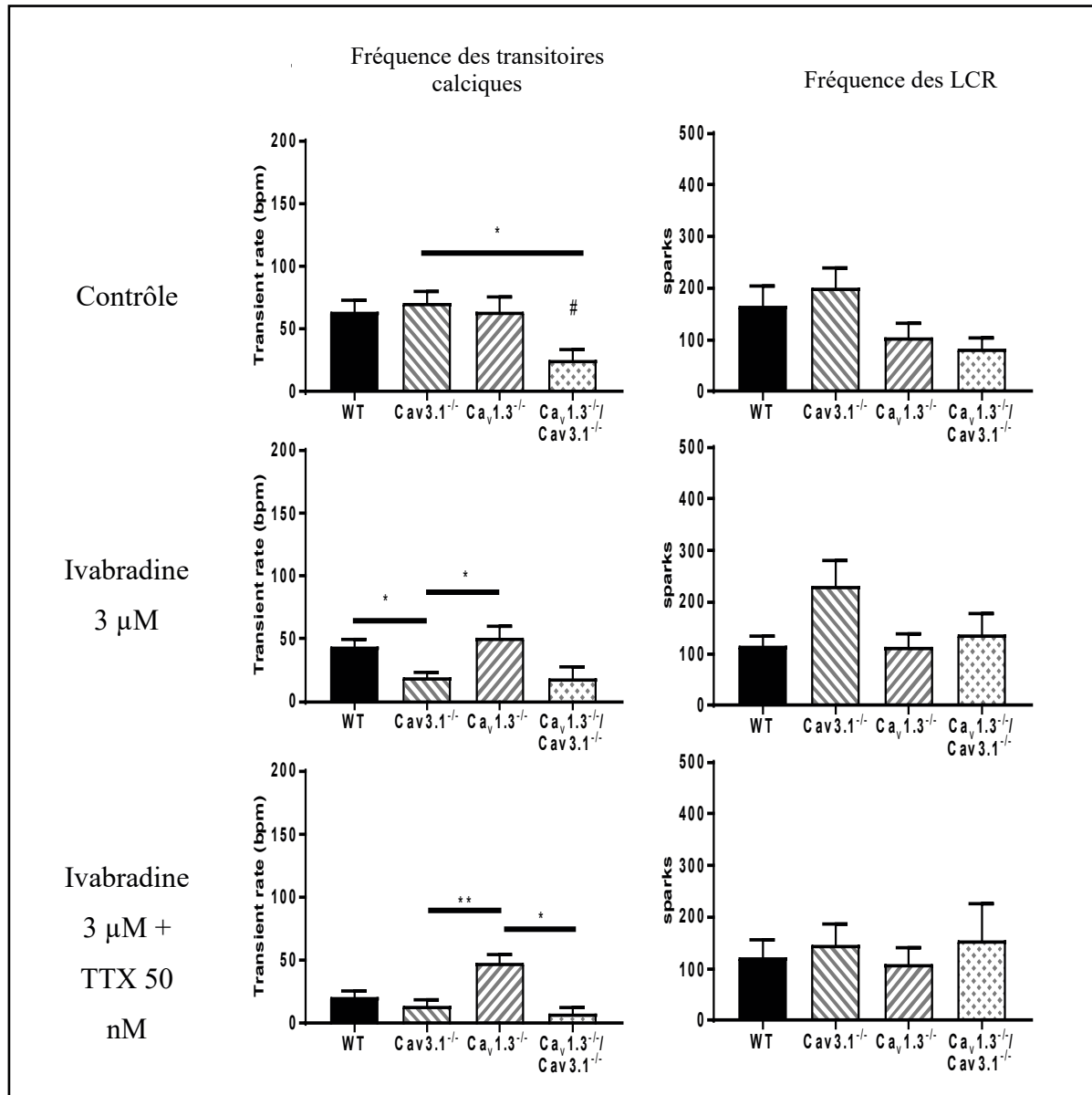
Les NSA sont composés d'une population hétérogène de cellules. L'activité électrophysiologique des cNSAs isolées est enregistrée en *patch clamp*, configuration « *current clamp* », afin d'analyser le potentiel de membrane et plus particulièrement la phase de DD où les canaux $Ca_v1.3$, $Ca_v3.1$, les HCN, et $Na_v1.1$ sont impliqués.

Les ablations des canaux calciques $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$, simple ou concomitante, diminuent la pente de la DD et par conséquent, ralentissent la fréquence des PA. Elles modifient également le seuil de déclenchement des PA (Eth) de tous les génotypes mutants par rapport au cNSA *WT*. On observe une diminution du potentiel de dépolarisation maximal (MDP) et une augmentation de la durée du PA par rapport au *WT* uniquement dans les cNSAs $Ca_v1.3^{-/-}$ (résultat suppl. 11).

La perfusion de 3 μ M d'IVA diminue la fréquence de PA dans tous les génotypes, particulièrement $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ qui ont une activité résiduelle très faible.

L'ajout d'une concentration de TTX à 50 nM provoque l'arrêt de l'activité *pacemaker* dans la majorité des cNSAs $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$.

7. Les LCRs dans les cNSAs ne sont pas synchronisés avec l'activité pacemaker.



Résultat 7 : Les histogrammes de la colonne de gauche montrent les fréquences des transitoires calciques de tous les génotypes dans les 3 conditions : contrôle, IVA 3 μM et IVA 3 μM+TTX 50 nM, mesurées en imagerie calcique en microscopie confocale. A droite, les libérations localisées de Ca²⁺ (Sparks/100 μm/s). WT N=2, n=31; Cav3.1^{-/-} N=2, n=23; Cav1.3^{-/-} N=2, n=15 Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} N=2, n=11. Kruskal Wallis test, non-parametric. # : Par comparaison avec WT.

L'observation de la dynamique calcique intracellulaire générée autour du RS dans les cNSAs complète les résultats obtenus en *patch clamp* sur l'activité des cNSAs.

Globalement, les fréquences de décharge calcique du RS appelée aussi transitoire calcique (« *calcium transient* ») sont relativement plus faibles que les fréquences de PA enregistrées en *patch clamp*. Ceci est causé par l'utilisation du traceur fluorescent du Ca^{2+} .

En condition contrôle, on relève une diminution significative de la fréquence de transitoire calcique dans les cNSAs du génotype $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ par comparaison avec *WT* et $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$.

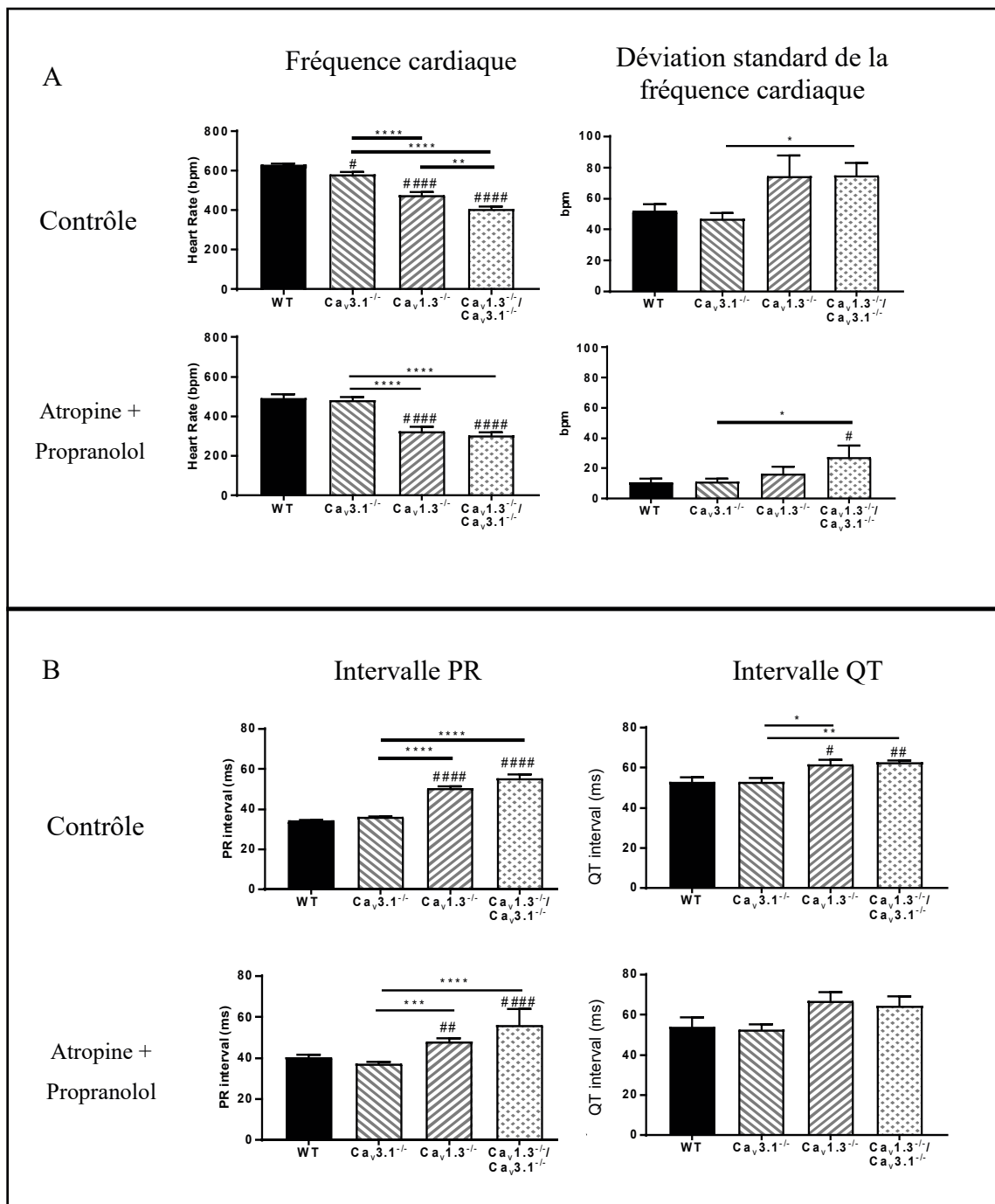
Le nombre de sparks calciques est le nombre de libérations de calcium au niveau du RyR2 (LCR, « *Local Calcium Release* ») entre deux transitoires calciques. Leur nombre est très variable, toutefois il n'évolue pas en fonction des génotypes.

L'IVA (3 μM) et la TTX (50 nM) diminuent la fréquence des transitoires calciques mais ne changent pas le nombre de sparks calciques.

Pour évaluer l'amplitude des transitoires calciques, on a effectué le rapport F/F_0 de l'intensité de la fluorescence : aucune différence significative n'a été relevée entre les différents génotypes et les différentes conditions de perfusion (résultat suppl. 13).

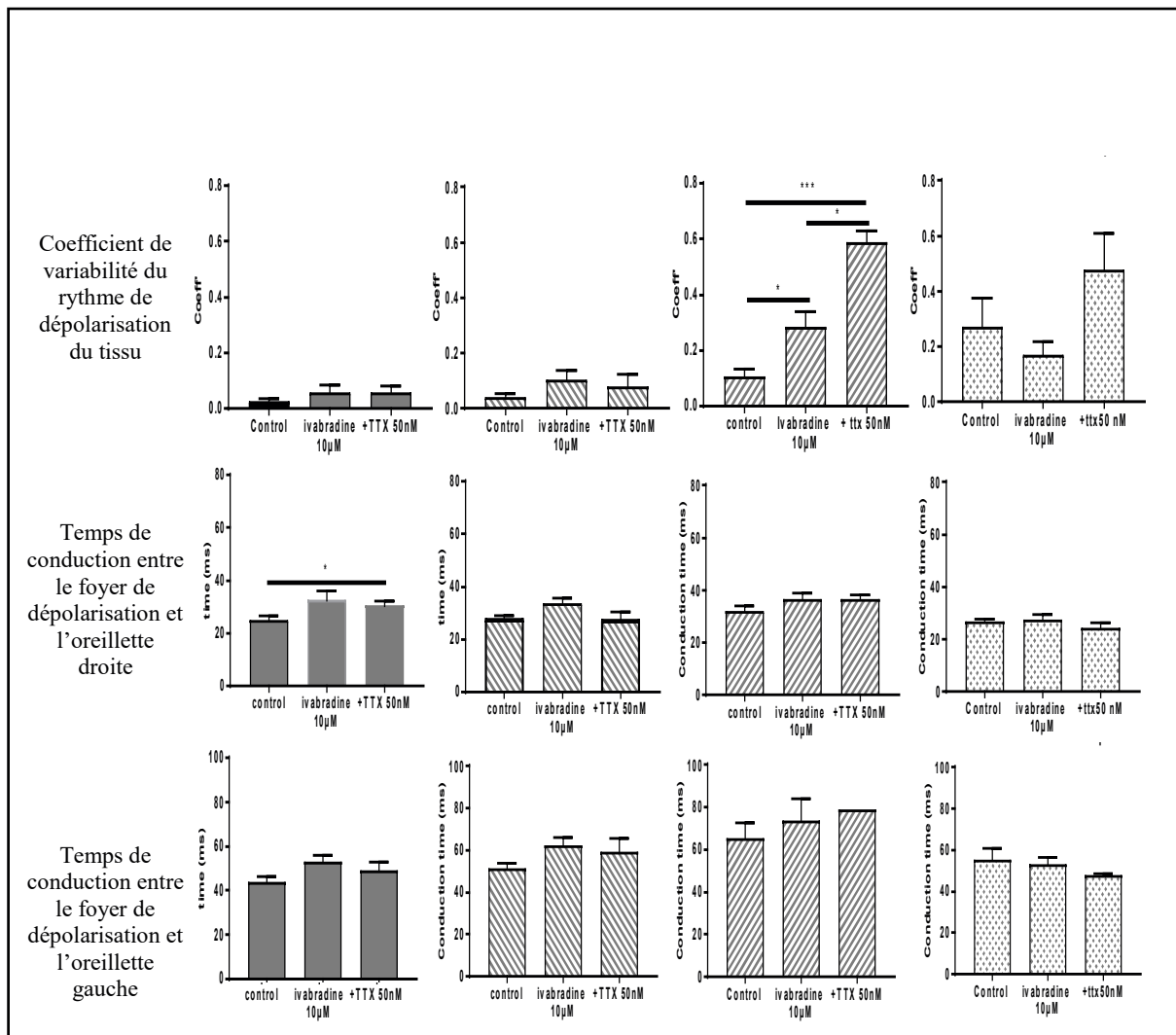
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

8. Caractéristiques de l'activité cardiaque *in vivo*.



Résultat 8 A : Fréquences cardiaques (à gauche) et déviation standard (à droite) des fréquences cardiaques enregistrées *in vivo* en condition contrôle (en haut) et après injection d'A+P (en bas). La fréquence cardiaque est mesurée à partir de l'intervalle RR. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. #: Par comparaison avec le WT. One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. **B :** Intervalles de temps entre l'onde P et l'onde R du complexe QRS à gauche et entre l'onde Q et l'onde T à droite, mesurés sur les ECGs enregistrés *in vivo* par télémétrie. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. #: En comparaison avec le WT.

9. Paramètres de l'activité dans le tissu sinusal enregistré en cartographie optique sous perfusion d'IVA 10 μ M et de TTX 100 nM.



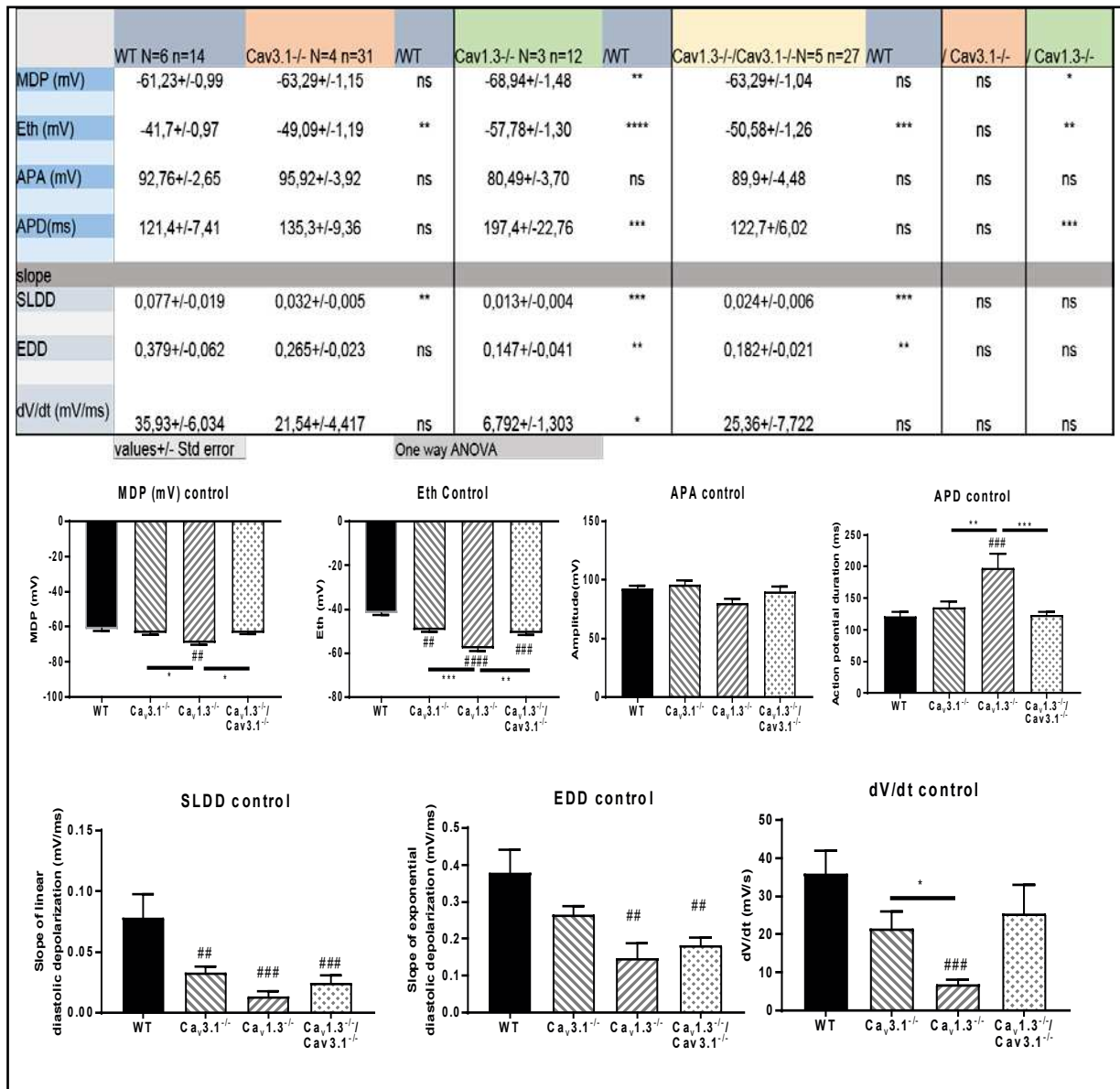
Résultat 9 : Coefficient de variabilité du rythme de dépolarisation des tissus et temps de conduction du signal provenant du foyer de dépolarisation jusqu'à la dépolarisation complète de l'oreillette droite ou gauche. WT N=8, $Cav3.1^{-/-}$ N=8, $Cav1.3^{-/-}$ N=7, $Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-}$ N=7. One way ANOVA.

10. Tableau de l'évolution des dysfonctions observées dans les NSA isolés en cartographie optique.

	Control condition			
	Activité pacemaker	Multiple foyer de dépolarisation	Foyer de dépolarisation ectopique	Défaut de conduction vers l'oreillette gauche
WT	8/8	0/8	0/8	0/8
Ca _v 3.1 ^{-/-}	8/8	4/8	0/8	0/8
Ca _v 1.3 ^{-/-}	7/7	4/7	1/7	3/7
Ca _v 1.3 ^{-/-} /Ca _v 3.1 ^{-/-}	7/7	7/7	3/7	1/7
	IVA condition			
WT	8/8	0/8	0/8	0/8
Ca _v 3.1 ^{-/-}	8/8	2/8	1/8	0/8
Ca _v 1.3 ^{-/-}	7/7	1/7	0/7	3/7
Ca _v 1.3 ^{-/-} /Ca _v 3.1 ^{-/-}	7/7	1/7	1/7	1/7
	IVA + TTX condition			
WT	8/8	1/8	1/8	0/8
Ca _v 3.1 ^{-/-}	7/7	1/8	1/8	0/8
Ca _v 1.3 ^{-/-}	2/7	0/2	1/2	0/2
Ca _v 1.3 ^{-/-} /Ca _v 3.1 ^{-/-}	3/7	1/3	1/3	1/3

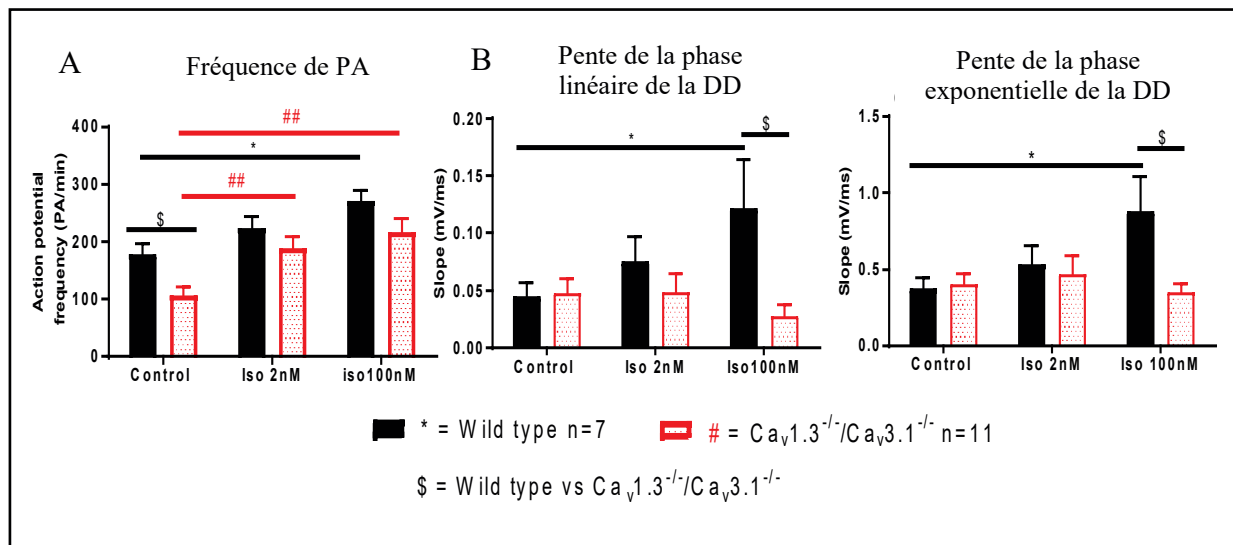
Résultat 10 : Tableau des dysfonctionnements de l'activité pacemaker et de la conduction du signal en cartographie optique. WT N=8, Ca_v3.1^{-/-} N=8, Ca_v1.3^{-/-} N=7, Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} N=7. Les évolutions des dysfonctions par rapport à la condition précédente sont surlignées en jaune. En condition contrôle, tous les tissus génèrent une activité spontanée au niveau du NSA. Les tissus mutants présentent en majorité des multiple foyers de dépolarisation (la moitié des Ca_v3.1^{-/-}, 4 sur 7 Ca_v1.3^{-/-} et tous les Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}). Quatre tissus présentent des foyers de dépolarisation ectopiques au NSA (1 /7 Ca_v1.3^{-/-} et 3/7 Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}) et ne conduisent pas le signal jusqu'à l'oreillette gauche (3/7 Ca_v1.3^{-/-} et 1/7 Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}).

11. Paramètres des potentiels d'action enregistrés en *patch clamp* sur les cNSAs isolées.



Résultat 11 : Paramètre des PA enregistrés en *patch clamp* sur cNSAs MDP: Potentiel maximal de dépolarisation (mV), Eth: Seuil de déclenchement d'un PA (mV), APA: amplitude de PA (mV), APD: Durée du PA (ms). Mesure des pentes linéaires (LDD), exponentielle de la DD (EDD) et de la phase de dépolarisation du PA (dV/dt). Les histogrammes et le tableau montrent les mêmes résultats.

12. Pentes de la DD et fréquence de PA sous l'effet de l'ISO dans les cNSAs isolées.



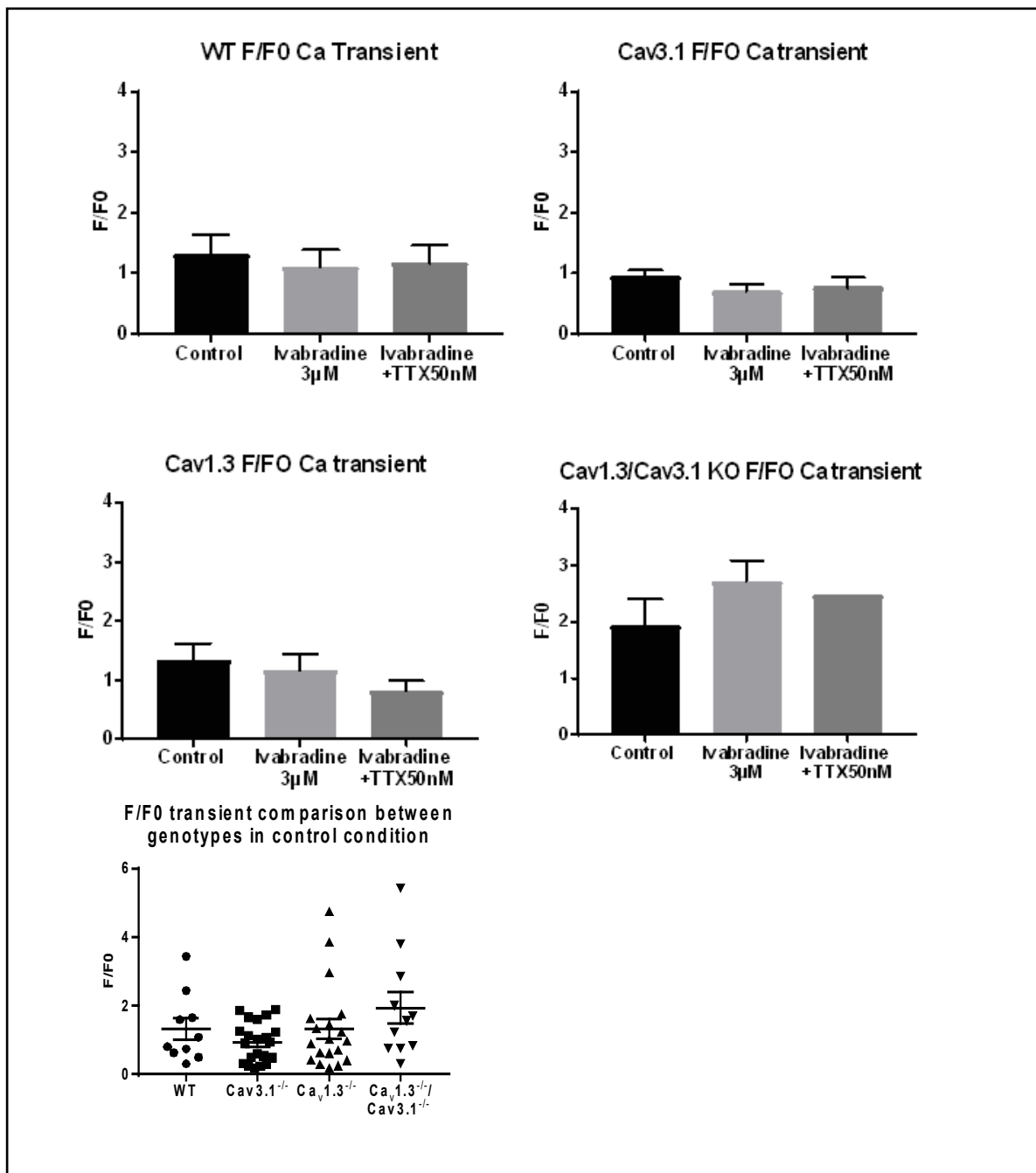
Résultat 12 A : L'histogramme montre la fréquence de PA de cNSAs WT et $Ca_v1.3^{-1}/Ca_v3.1^{-1}$ en condition contrôle et sous perfusion de 2 ou 10 nM d'ISO. La concentration d'ISO 2 nM normalise la concentration en AMPc dans les cellules alors que 100 nM est une concentration saturante qui stimule fortement la production d'AMPc. **B :** Les histogrammes montrent l'évolution des pentes de la DD dans ces mêmes conditions.

Pendant la phase de DD des cNSAs $Ca_v1.3^{-1}$ et $Ca_v1.3^{-1}/Ca_v3.1^{-1}$, la présence de « DAD » indique une activité dépolarisante mais insuffisante pour atteindre le seuil de déclenchement d'un PA (résultat 6).

Dans les résultats suppl. 12, on observe que la perfusion d'ISO 2 ou 100 nM accélère la fréquence de PA dans les cNSAs WT et $Ca_v1.3^{-1}/Ca_v3.1^{-1}$. Étrangement, la perfusion d'ISO n'augmente pas la pente de la DD dans les cNSAs $Ca_v1.3^{-1}/Ca_v3.1^{-1}$.

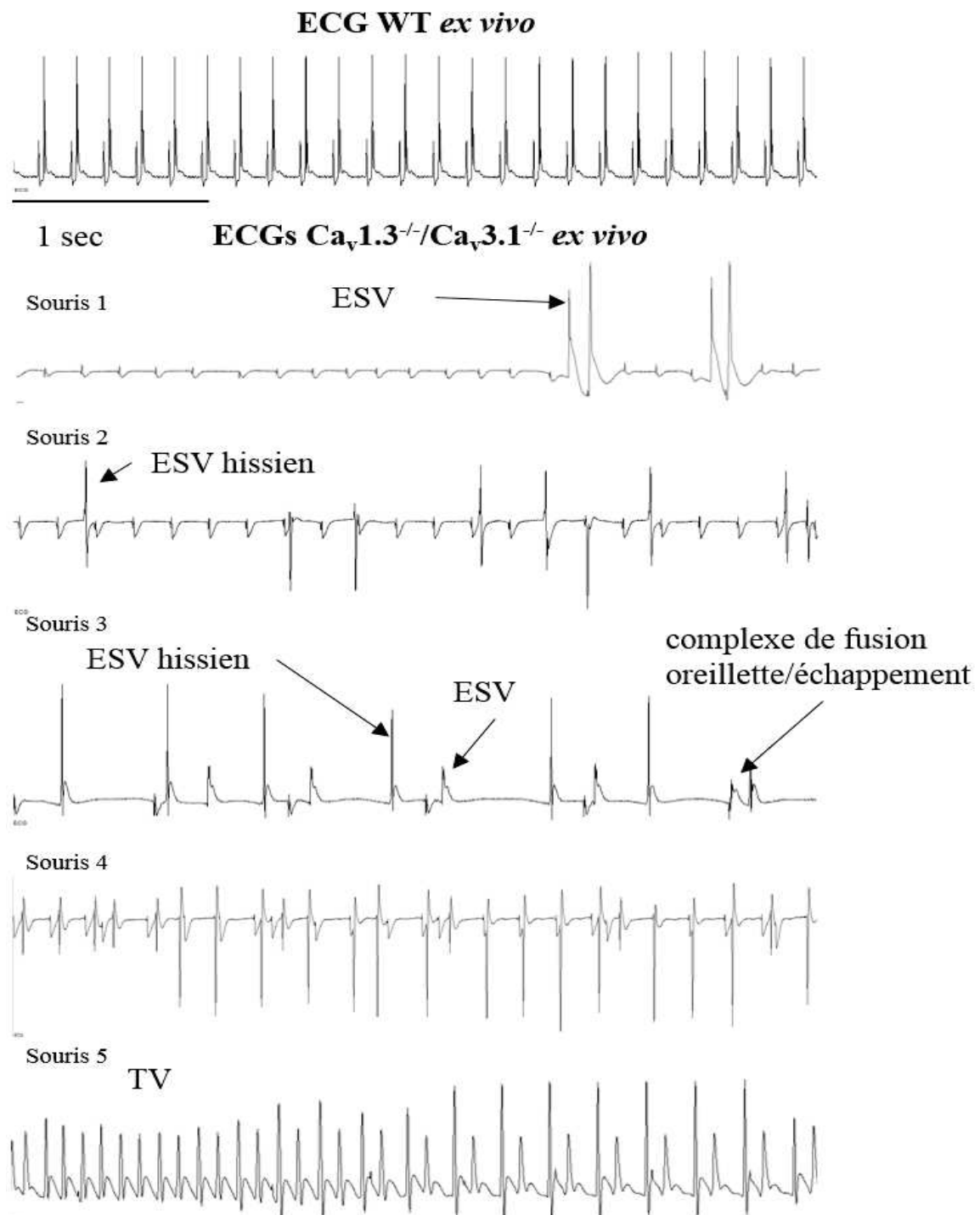
Ces observations paradoxales peuvent s'expliquer par une conversion des DAD en PA sous l'effet de l'ISO.

13. Amplitude des transitoires calciques enregistrée dans les cNSAs isolées



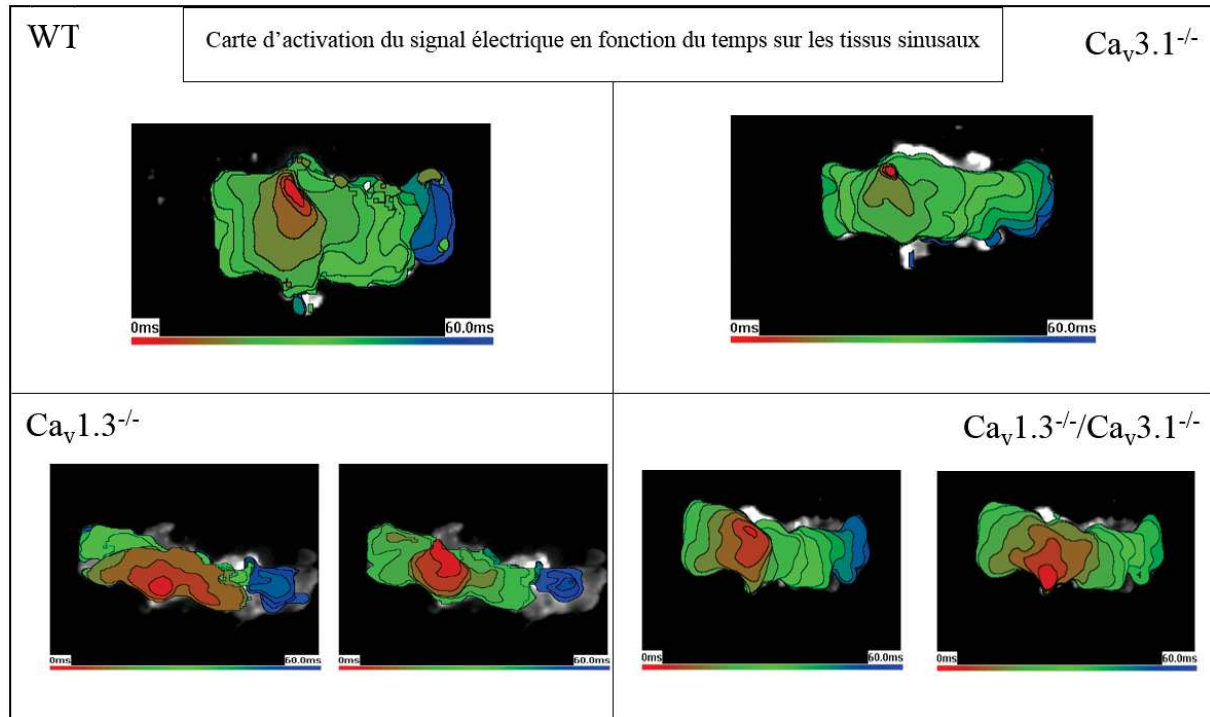
Résultat 13 : Les histogrammes montrent les amplitudes des transitoires calciques normalisées F/F0 enregistrées en imagerie calcique sur cNSAs dans tous les génotypes en fonction des conditions. Le dernier histogramme montre l'amplitude des transitoires calciques en fonction des génotypes en condition contrôlée. Peu de variations sont relevées.

14. ECGs enregistrés sur un coeur WT par comparaison avec des coeurs $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ sur le système Langendorff



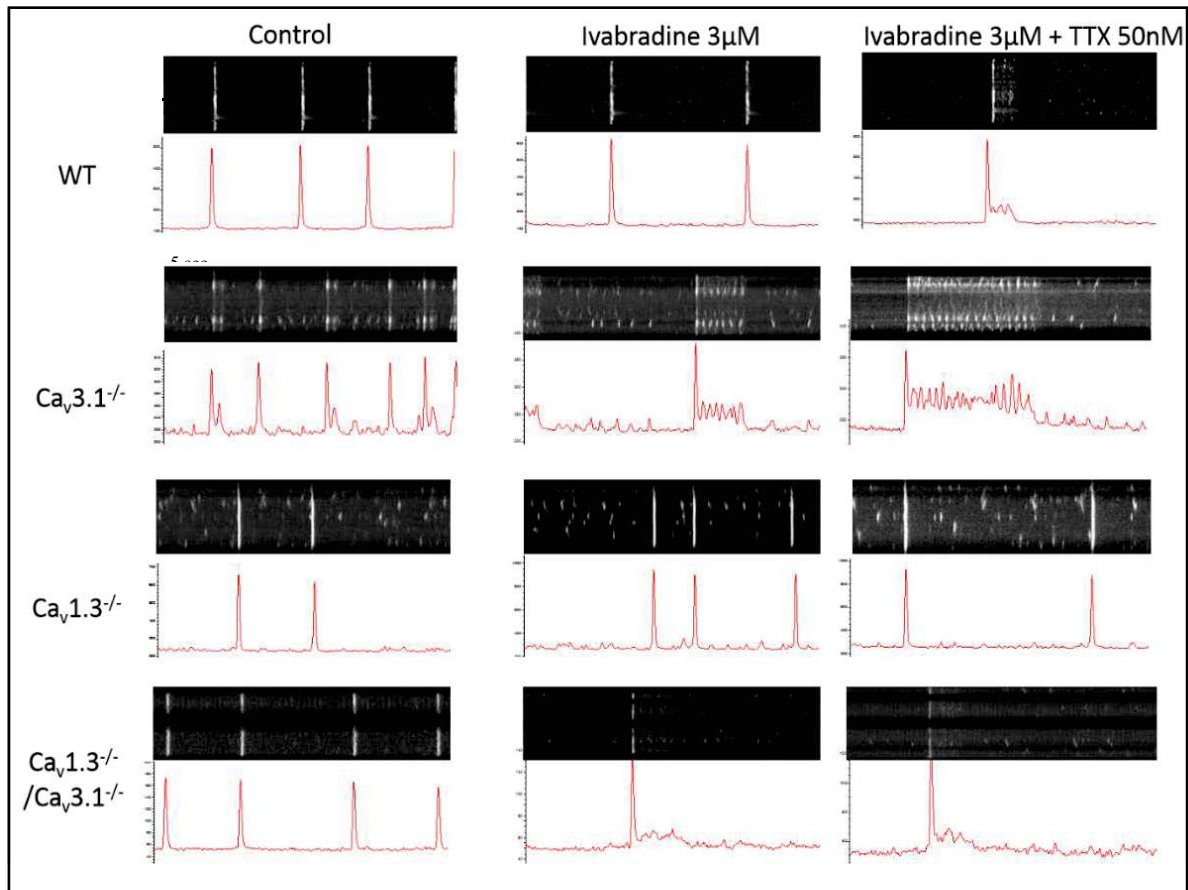
Résultat 14 : Enregistrements ECG de l'activité cardiaque des coeurs perfusés sur le système Langendorff. Les dysfonctions principales relevées sont des ondes P inversées, des extrasystoles ventriculaires (ESV), des rythmes d'échappement ventriculaires et des phases de tachycardie ventriculaire (TV).

15. Illustration des foyers de dépolarisation et de la conduction sur des cartes d'activation du tissu sinusal.



Résultat 15 : Carte d'activation des tissus des différents génotypes avec un gradient colorimétrique de 4 msec par couleur. Les cartes d'activation du signal électrique dans les tissus sinusaux permettent d'observer le foyer de dépolarisation et le motif de propagation du signal en fonction du temps. Les cartes d'activation de $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ illustrées ci-dessus correspondent à l'activité d'un même tissu pour chaque génotype. Elles montrent le phénomène de multiple foyer de dépolarisation au sein d'un même tissu.

16. Images et tracés de l'activité calcique dans les cNSAs isolées enregistrées en microscopie confocale.



Résultat 16 : Fluorescence calcique enregistrée en microscopie confocale sur des cNSAs marquées au CAL520. Images analysées sur ImageJ et tracés de l'activité reportés sur Clampfit. Les transitoires calciques (bandes) se distinguent facilement sur l'image et le tracé alors que les sparks (points) sont plus petits.

DISCUSSION

Notre étude sur l'activité *pacemaker* du NSA à l'aide de l'ensemble des souris $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ est une première. Les diverses approches expérimentales *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ont permis d'étudier le fonctionnement de l'automatisme cardiaque dans ces modèles de physiopathologies cardiaques. Par ailleurs, l'étude permet de mieux comprendre le rôle des différents éléments impliqués dans le mécanisme *pacemaker* et d'éclaircir les connaissances sur la nature de ce phénomène.

Effet des ablations des canaux calciques sur l'automatisme cardiaque.

Premièrement, nos résultats confirment que $Ca_v1.3$ est l'isoforme principale des canaux calciques de type L impliquée dans le mécanisme *pacemaker* et s'inscrivent dans la continuité des études précédentes (Mangoni, Couette et al. 2003, Marger, Mesirca et al. 2011).

En effet, l'ablation génétique « perte de fonction » de ce canal provoque une altération de l'activité spontanée. Les fréquences atriales mesurées *in vivo* sont guidées par l'activité du NSA défaillant sans $Ca_v1.3$. Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ développent également des dysfonctions de la conduction atrioventriculaire (AVB et intervalle PR plus long) et un retard dans la phase de relaxation (QT plus long) (résultat 8). Egalement, les fréquences de dépolarisation sur les cœurs, les tissus et les cellules isolées de $Ca_v1.3^{-/-}$ sont réduites et présentent un profil arythmique (résultats 1,3,4,6,8,9).

Puis l'implication de $Ca_v1.3$ dans la conduction du signal est montrée *ex vivo* sur le cœur et le tissu isolé. D'une part sur le système Langendorff, les rythmes atriaux et ventriculaires se dissocient en cas d'AVB de III^{ème} degré (résultat 3). D'autre part, en cartographie optique sur les tissus isolés, la conduction du signal issu du foyer de dépolarisation vers les oreillettes est plus lente (résultat 4). Certains tissus $Ca_v1.3^{-/-}$ présentent même une défaillance complète de la conduction vers l'oreillette gauche, en effet le signal s'arrête au niveau du septum interatrial (résultat 10).

En absence de $Ca_v1.3$, l'apparition de foyers de dépolarisation ectopiques montre l'importance de ce canal au sein du NSA dans le maintien du *pacemaker*.

Le canal calcique de type T $Ca_v3.1$ est également impliqué dans l'automatisme mais sa fonction et sa régulation ne sont pas encore totalement définies. D'après nos résultats et les études précédentes, les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ ne développent qu'une bradycardie modérée d'origine sinusale (~10 %) (résultat 1).

La mutation « perte de fonction » de $Ca_v3.1$ est plus marquée dans les phases d'expérimentations *ex vivo* sur tissus. Dans les tissus $Ca_v3.1^{-/-}$, les foyers de dépolarisation relevés en cartographie optique sont plus éparses mais restent néanmoins regroupés dans la zone du NSA (résultat 4). Le rythme reste stable grâce à la présence de $Ca_v1.3$ (résultat 9).

$Ca_v3.1$ est activé pendant la phase linéaire de la DD, faisant le pont entre l'activité du courant I_f et l'activation de $Ca_v1.3$. On peut supposer que $Ca_v3.1$ possède un rôle de soutien dans la DD.

Les ablations additionnelles des deux canaux calciques réduisent la fréquence atriale d'en moyenne 220 bpm *in vivo*, soit plus d'un tiers de la fréquence de base atriale enregistrée chez les souris *WT* (autour de 600 bpm). Le génotype $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ possède les mêmes caractères physiopathologiques que $Ca_v1.3^{-/-}$ avec des accentuations des défauts de conduction de type AVB (résultat 1). L'injection d'A+P supprime presque entièrement les phénomènes d'AVB suggérant que le tonus du SNA a un effet délétère sur la conduction atrioventriculaire dans ce mécanisme *pacemaker* sans ces canaux.

Dysfonctions des centres rythmogènes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$

Ex vivo, l'activité cardiaque des génotypes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ s'exprime de manière fortement désynchronisée. La dissociation quasi-totale du rythme atrial et du rythme ventriculaire observée sur les cœurs isolés perfusés (Langendorff) montre que le NAV n'effectue plus son rôle de conducteur du signal électrique atrioventriculaire sans $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ (et sans $Ca_v1.3$ uniquement dans quelques cœurs). Le rythme de contraction ventriculaire devient indépendant de l'activité atriale. L'activité atriale est arythmique, elle varie entre des phases rapides de fibrillation et des phases à fréquence lente et intermédiaire.

L'activité ventriculaire peut provenir des faisceaux de His et du réseau de FP qui possèdent cette capacité de génération de l'automatisme. Des événements de conduction rétrograde et des rythmes d'échappement ventriculaires ont été observés et montrent que cet automatisme ventriculaire est de nature plus arythmique que le rythme atrial. Les ECG enregistrés *ex vivo* sont difficilement interprétables et justifient l'approche expérimentale en cartographie optique pour l'étude précise de l'activité du NSA.

Sur tissu isolé, ce génotype $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ développe une fréquence de dépolarisation plus lente associée à une variabilité du rythme plus instable (résultat 9). La multiplication des foyers de dépolarisation est systématique et les phénomènes ectopiques plus importants (3 tissus sur 7) que dans les tissus simples KO $Ca_v1.3^{-/-}$. Ces observations sur les foyers de dépolarisation laissent penser qu'il existe un remodelage du tissu.

La génération spontanée de PA des cNSAs $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ est réduite et irrégulière vis-à-vis des cellules *WT*, surtout à cause de l'ablation $Ca_v1.3$. Les DD entre deux PA sont allongées et aplaties, ou bien elles présentent des oscillations qui traduisent une activité des éléments résiduels du *pacemaker*, trop faible pour atteindre le seuil de déclenchement d'un PA (événements appelées « *Delayed after depolarization* » ; DAD) (résultat 12).

Les animaux $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ sont affaiblis et en difficulté sur des tests à l'effort de type tapis roulant. Néanmoins la stimulation adrénergique *via* l'injection IP d'ISO 0.1 mg/kg déclenche

une augmentation de la fréquence cardiaque (résultat 1). Les canaux HCN directement sensibles à $[AMPc]_i$ sont toujours présents et la voie de régulation directe de l'AMPc sur le domaine CNBD est probablement le contributeur principal de l'accélération du rythme cardiaque.

Les pentes linéaires et exponentielles dans lesquelles sont activées respectivement $Ca_v3.1$ et $Ca_v1.3$ sont aplaties sans l'expression des canaux.

In vitro, la perfusion d'ISO 2 nM n'augmente pas la pente de la DD mais accélère la fréquence de PA, ce qui montre que d'autres éléments présents dans les cellules pacemaker cardiaques, tels que $Ca_v1.2$ et NCX, ne peuvent substituer les canaux mutés. L'augmentation de la fréquence de PA serait donc due aux phénomènes de DAD qui se convertiraient en PA (résultat 12).

Quoique les cellules $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ aient une activité spontanée, l'activité du NSA isolé semble trop faible et désynchronisée sans ces canaux calciques pour générer une activité viable et adaptée à la physiologie de l'organisme.

D'un point de vue pratique, la caractérisation de l'activité cardiaque permet de valider la souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ comme modèle de CHB. Mais ce modèle nous est surtout utile pour l'étude fonctionnelle du mécanisme *pacemaker* en association avec des outils pharmacologiques sélectifs.

Dans ce modèle double mutant dénué des deux VDCC de la DD, à quoi correspond l'activité résiduelle du *pacemaker* ?

L'ablation concomitante de Cav1.3 et Cav3.1 réduit la fréquence cardiaque des souris d'environ 200 bpm, soit un tiers de la fréquence cardiaque de base mesurée chez les souris *WT*. L'inhibition d' I_f par l'IVA réduit la fréquence cardiaque de 200 bpm dans tous les génotypes étudiés. Par comparaison avec le génotype *WT* en condition contrôle, l'IVA dans le génotype $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (et $Ca_v1.3^{-/-}$), réduit de deux tiers la fréquence cardiaque laissant un rythme résiduel de 200 bpm de moyenne. La fréquence cardiaque de certains individus du génotype double mutant atteint même un rythme inférieur à 100 bpm. Soit une diminution de plus de 85 % de la fréquence cardiaque initiale mesurée chez les individus *WT* en condition contrôle. Cela correspondrait chez l'humain à un rythme résiduel d'une dizaine de bpm. Néanmoins chez la souris, il y a une activité cardiaque résiduelle soutenant la vie de l'animal, sans les éléments *pacemaker* I_f , $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$.

L'effet relatif de l'IVA n'est pas différent en fonction des génotypes, ce qui suggère qu'il n'y a pas de remodelage de l'expression d'HCN dans le tissu sinusal (résultat 2).

La perfusion d'IVA dans les approches *ex vivo* diminue l'activité spontanée. L'effet de l'inhibiteur sur le *pacemaker* est constant. Ajoutée aux ablations génétiques, l'activité résiduelle est soutenue par une dizaine de bpm sur le cœur, le tissu sinusal et les cNSAs.

Un autre canal ionique associé à la DD après $Ca_v1.3$, $Ca_v3.1$ et I_f est le canal sodique $Na_v1.1$ qui peut être inhibé par une faible dose de TTX (50 nM *in vitro* et 100 nM *ex vivo*). L'ajout de TTX et d'IVA sur le génotype $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ provoque une faible diminution de l'activité *pacemaker* mais peut aussi engendrer un arrêt total de l'activité spontanée. C'est ce qui est observé dans 5 tissus sinusaux sur 7 de génotype $Ca_v1.3^{-/-}$ et 4 sur 7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, et la plupart des cNSAs en *patch clamp* (résultats 4).

Cela montre que l'ensemble des courants entrants pendant la DD correspond à la génération de l'activité spontanée. Les tissus mutants $Ca_v1.3^{-/-}$ possédant une activité spontanée résiduelle sous la perfusion d'IVA+TTX acquièrent de nouveaux signes de dysfonction comme l'apparition de foyer ectopique concilié à un rythme de dépolarisation plus variable.

Le modèle du Ca²⁺ clock est désuet.

Notre étude éclaire la compréhension du mécanisme complexe et controversé de la génération du *pacemaker* cardiaque. A prime abord divisé par les modèles de l'horloge calcique et de l'horloge membranaire, les connaissances sur l'origine de la spontanéité des cNSAs sont plus avancées.

Les mutations associées aux inhibitions des canaux ioniques majeurs impliqués dans la DD peuvent entraîner une suppression complète de l'activité spontanée *pacemaker*. En parallèle, les mesures de la dynamique du calcium intracellulaire dans les mêmes conditions (IVA et IVA+TTX) sur les génotypes mutants montrent que la fréquence des transitoires calciques est aussi sensible à l'inhibition de ces canaux ioniques.

La fréquence des transitoires calciques est associée à la fréquence des PA et à l'activité *pacemaker*.

En revanche, il n'y a pas de changement significatif concernant le nombre des sparks calciques (résultat 7). Les phénomènes de sparks sont supposés, d'après le modèle du *Ca²⁺ clock*, participer à la phase exponentielle de la DD et permettre l'activité spontanée.

La non-corrélation des sparks avec la fréquence de dépolarisation des cNSAs montre que ces phénomènes ne sont pas déterminants dans la génération de l'activité *pacemaker*.

CONCLUSION

Cette étude suit la ligne directrice de l'équipe dans la thématique de recherche fondamentale sur la compréhension du mécanisme de génération de l'activité *pacemaker* cardiaque. L'utilisation de trois modèles de souris génétiquement modifiées avec les multiples approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ainsi que celle des préparations *ex vivo* et *in vitro* de cœur, de tissu sinusal et de cellules *pacemaker* isolées sont inédites. De plus, l'analyse et la synthèse de l'ensemble des résultats permettent de mieux comprendre l'origine des dysfonctions sinusales et des troubles de la conduction atrioventriculaire liés à la perte de fonction des canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$.

Ex vivo, les rythmicités atriales et ventriculaires des cœurs $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ sont totalement dissociés. Il est difficile d'imaginer que ces cœurs parviennent à soutenir une fonction vitale viable *in vivo* sans l'intervention de mécanismes compensatoires comme l'activité du système nerveux autonome ou le couplage mécano-électrique. Ces observations faites sur les modèles murins sont importantes pour la compréhension des dysfonctions sinusales liées à perte de fonction des VDCCs chez l'homme.

L'intérêt de cette étude est d'apporter de nouveaux éléments d'informations sur le rôle des canaux ioniques dans l'activité *pacemaker* grâce aux génotypes de souris croisés $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. A partir de ce modèle, il a été possible d'évaluer l'impact fonctionnel des autres canaux ioniques principaux impliqués dans la DD.

En conclusion, ce travail montre que l'activité des canaux membranaires prédomine sur le mécanisme du Ca^{2+} clock dans la génération de l'activité *pacemaker* cardiaque, notamment grâce à $Ca_v1.3$ et I_f .

L'observation de l'activité du NSA isolé grâce à la cartographie optique montre l'impact des mutations des VDCCs sur les sites de dépolarisation et la conduction du signal électrique *pacemaker*. Les résultats marquent l'importance de $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ dans l'activité *pacemaker* au niveau sinusal, la conduction et l'automatisme dans son ensemble. A l'avenir, il serait également intéressant de coupler la technique de cartographie optique sur le cœur entier isolé et perfusé en système Langendorff, afin d'analyser l'activité électrique cardiaque dans son ensemble chez les souris KO. Ces expériences supplémentaires permettraient de mieux

interpréter l'automatisme dissocié des souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. De plus, des analyses génomiques sur le tissu sinusal isolé, ou un groupe de cNSAs isolées, permettraient d'évaluer le niveau d'expression des autres canaux ioniques du mécanisme *pacemaker* et d'expliquer certainement les phénomènes d'adaptation tels que l'apparition de multiples sites de dépolarisation dans les régions sinusales de différents génotypes de souris KO.

In vitro sur les cNSAs isolées, les enregistrements en *patch clamp* et en imagerie calcique montrent respectivement les PAs et la dynamique calcique intracellulaire. Dans le modèle $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ sous perfusion d'Ivabradine et de TTX, le profil électrophysiologique des cNSAs perd son caractère spontané et se rapproche des cardiomyocytes du myocarde contractile. L'arrêt de l'activité spontanée des cNSAs symbolise ce rapprochement, ce qui démontre le caractère essentiel des canaux ioniques de la DD dans l'automatisme. Afin de comprendre les différents phénomènes observés dans chacune des approches *in vitro*, il serait intéressant de coupler ces deux techniques grâce à un setup de *patch clamp* associé à un microscope confocal.

Cette thématique de recherche fondamentale présente un grand intérêt pour les cliniciens. De nombreuses stratégies innovantes apparaissent pour suppléer l'implant pacemaker électronique et nécessitent une compréhension parfaite du mécanisme fondamental du *pacemaker*. La recherche fondamentale sur cette thématique est donc primordiale pour parvenir à une nouvelle thérapie pratique, efficace et accessible, contre les dysfonctions du rythme sinusal.

ANNEXES

Table des figures et des résultats

Figures

Figure 1: Images tridimensionnelles du cœur humain et du système de conduction mis en évidence par micro tomographie informatisée (micro-CT). B: Les 4 cavités cardiaques sont les oreillettes droite (RA) et gauche (LA) et les ventricules droit (RV) et gauche (LV). A, D, F: Le tissu conducteur du cœur entier, dans l'ordre de la conduction : le nœud sinusal central (bleu) et la zone paranodale (turquoise), l'axe de la conduction à travers le nœud atrioventriculaire (AVCA, vert), la branche droite du faisceau de His (RBB, rouge) qui se ramifie en réseau de Purkinje (RPN) et la branche gauche du faisceau de His (LBB ; violet) qui se ramifie en Purkinje également (LPN). C, D, E & F: Relation anatomique entre la racine de l'aorte (Ao) et la charnière du réseau coronarien gauche (LCL), droit (RCL) et non coronarien (NCL). D'autres éléments sont mis en évidence sur ces coupes : l'anneau de la valve mitrale (MA) et tricuspide (TA), la voie d'éjection ventriculaire droite (RVOT), la fosse ovale (FO) et le sinus coronarien (CS). D'après Stephenson et al. 2017 _____ 21

Dessin de la circulation sanguine à gauche. Vésale (1514-1564), médecin de Charles Quint publie "De corporis humani fabrica" en 1543 relatant ses travaux de dissection dont les dessins sont attribués à Titien. _____ 23

Figure 2 : Schémas des voies de régulation adrénérergique, muscarinique et de l'adénosine sur l'AMPC dans l'automatisme d'une cellule du NSA. A : La voie β -adrénérergique active la production d'AMPC qui favorise l'ouverture des canaux ioniques dépendants du voltage directement ou via la PKA. La PKA active également les composants de la dynamique calcique du réticulum sarcoplasmique. B : Voies de signalisation muscarinique soutenue par la voie de l'Adénosine. D'après Mangoni et Nargeot, 2008. _____ 26

Figure 3: Innervation du cœur. Marquage histochimique de l'acétylcholine estérase (AChE) qui permet de mettre en évidence l'innervation du cœur chez la souris dont l'organisation est similaire à l'homme. A : Schéma de la distribution et de la morphologie des principales voies nerveuses et ganglions. B : (a et b) Macrophotographies qui montrent le réseau du système nerveux (têtes de flèches noires) et les ganglions (têtes de flèches blanches) au niveau atrial. (b et c) Zooms réalisés sur des ganglions où les petites flèches noires montrent les nerfs interganglionnaires et les blanches les neurones des ganglions. D'après Rysevaite K. et al., 2011. _____ 27

Figure 4 : Photographies des différents types de cNSA chez le lapin. D'après Verheijck et al., 1998. _____ 29

Figure 5 : Schéma du phénomène « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release » dans une cellule musculaire. Le RS est au plus proche de canaux calciques de type L à l'intérieur des tubules T pour un effet plus efficace de l'entrée de Ca^{2+} sur le récepteur à la Ryanodine. La grande quantité de Ca^{2+} libérée par le RS est utilisée pour le couplage actine-myosine. Puis il est recyclé pour recharger le RS via la pompe SERCA, intégré dans le cycle de Krebs de la

mitochondrie ou extrudé de la cellule en échange d'autres cations. Image issue du département de physiologie de l'université de Mahidol. _____ 31

Figure 6: Structure du NSA chez l'humain en micro-CT. a, b, c : Coupes transversales du NSA humain entouré de turquoise situé proche de la Crista terminalis (CT). d : Image du sinus dans l'axe longitudinale sous la veine cave supérieure (SCV). e : Sinus (SN) en entier. f : Zones de découpe transversale vues en micro tomographie informatisé. D'après Stephenson et al., 2017 _____ 34

Figure 7 : Modélisation 3D du NSA chez le lapin. A : Orientation des cellules myocardiques du côté endocardique (gauche) et épicaudique (droite) B : Les lignes noires montrent l'orientation des cardiomyocytes. C : Modèle 3D de l'oreillette droite. D : Emplacement du NSA au niveau du cœur entier, sur l'oreillette droite (RA). Les autres structures indiquées sont l'aorte (Ao), l'artère pulmonaire (PA), la veine pulmonaire (PV), le sinus coronarien (CS) et le ventricule droit (RV). D'après Dobrzynski et al. 2005. _____ 36

Figure 8 : Caractéristiques histologiques et immunohistochimiques du NSA chez l'humain. A : Coupe transversale du NSA et coloration de type trichromie de Masson permettant de distinguer les cellules du tissu connectif. B et C : Les immunomarquages de Cx43 et d'ANP permettent de distinguer le NSA du reste du tissu auriculaire et de mettre en évidence l'hétérogénéité de la zone paranodale. D'après Chandler et al. 2009. _____ 37

Figure 9 : Cartographie électrique du NSA. A : Au niveau du NSA central marqué d'un astérisque, les chiffres indiquent le temps d'activation de chaque zone en ms. B : Les PAs enregistrés par une microélectrode. Le NSA central sous la branche droite du cercle sinusal (SARB), montre un temps d'activation court de 2 ms et une forme caractéristique du potentiel de membrane (2^{ème} tracé en B). La partie atriale au niveau de la crista terminalis (CT) et du septum interatrial (IAS) est différenciée par la forme droite du potentiel (1^{er}, 4^{ème} et 5^{ème} tracés). La zone de transition est marquée par un temps d'activation plus long et une forme de potentiel (3^{ème} potentiel) entre celui du NSA central et le potentiel atrial. C & D : Un zoom sur la partie centrale du NSA montre la présence d'une activité électrique de type atrial très proche du NSA central (2^{ème} tracé en D) alors que des potentiels de type « nodaux » sont enregistrés dans des zones plus éloignées (1^{er} et 3^{ème} potentiels). D'après Verheijck, Van Kempen et al. 2001. _____ 39

Figure 10 : Modèle numérique du NSA et voies d'échappement de la conduction à partir de données recueillies chez le chien et chez l'humain. A : Le NSA (rouge) est isolé par 3 bifurcations de l'artère coronaire (bleue) et de la fibrose (violet). Les branches jaunes représentent les voies de conduction du signal électrique. B : Des voies de conduction sont dominantes, les points roses représentent des zones de l'oreillette activées. Préférentiellement pour une contraction adéquate, les zones dans l'oreillette droite sont favorisées. C : Déplacement de l'épicentre du signal sans changement de voie de conduction. D : Echec de conduction. D'après Fedorov et al., 2012. ____ 41

Figure 11 : Localisation du NAV. A : Localisation anatomique du nœud atrioventriculaire (AVN) et des faisceaux des His déterminé par l'expression de NF-M. Le NAV fait partie intégrante du triangle de Koch, se projetant sous le sinus coronarien (CS) par l'extension postérieure nodal (PNE), il est constitué d'un centre nodal compact au-dessus de la valve tricuspide (TV) à l'apex du triangle. B : Gradient colorimétrique de l'expression des isoformes de connexines et d'HCN4 à la jonction du NAV et du faisceau de His chez le lapin. Efimov et al, 2004. _____ 43

Figure 12 : Les différentes causes des SSS. Monfredi et al. 2010	45
Figure 13 : ECG type et triangle d'Einthoven. A : Ondes PQRST de l'ECG. B : Triangle d'Einthoven dans lequel est placé le cœur.	46
Figure 14 : Les différents ions tels que le K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ou le Cl^- suivent leur gradient de concentration entre le milieu extra et intracellulaire lors de l'ouverture de ces canaux. (Images de « Servier medical art »)	55
Figure 15 : Schéma du cœur et des différents potentiels d'action. Les PAs typiques (droite) des différentes régions du cœur (gauche) en suivant de haut en bas l'axe de la conduction. D'après Monfredi et al., 2010 inspiré par (Li, Greener et al. 2008) et (Dobrzynski, Boyett et al. 2007).	57
Figure 16 : Simulation numérique de l'activité spontanée d'une cellule pacemaker de souris, montrant des potentiels d'action et les courants ioniques contribuant. D'après Mesirca et al., 2018.	59
Figure 17 : Portrait d'Arthur Keith et ses dessins représentant la partie dorsale de l'oreillette droite humaine et la coupe longitudinale du NSA. 1907	61
Photographie du Dr. Denis Noble, Dr. Dario Di Francesco et Dr. Susan Noble, 1977. Oxford. Collection personnelle.	65
Figure 18 : Enregistrements de Dario DiFrancesco en 1980. Le potentiel d'inversion du courant activé dans la fenêtre du pacemaker est aboli quand I_{K1} est bloqué par le Ba (à droite). En haut à gauche, le protocole descendant à un voltage très bas induit un courant qui devient de plus en plus petit (en bas à gauche). En présence de Ba 5 mM, côté droit, même avec un protocole extensif qui descend le voltage jusqu'à -165 mV, il n'y a pas de potentiel d'inversion. DiFrancesco conclut que l'inversion dépendait d' I_{K1} . D'après DiFrancesco et al., 1980.	67
Figure 19 : Illustration de l'implication du Ca^{2+} clock (rouge) dans la phase exponentielle de la DD (late DD) du potentiel de membrane. D'après Lakatta et al. 2010.	73
Figure 20 : Structure tétramérique du canal HCN. Le domaine C terminal est composé d'un « C-linker » et d'un CNBD pour la fixation à l'AMP cyclique. D'après Biel et al., 2009.	79
Figure 21 : Expression d'HCN4 dans le NSA. A : Image de l'hybridation in situ d'ARNm d'HCN4. B : Degré d'expression des ARNm d'HCN1 et d'HCN4 dans le NSA central, la zone paranodale et l'oreillette. D'après Tellez JO et al., 2006.	81
Figure 22 : A : Courbe du déplacement du seuil d'activation d' I_f en fonction de la concentration en AMPc (Di Francesco et al. 1991). B : Tracés enregistrés en patch clamp montrant le potentiel de membrane de cNSA de lapin sous l'effet chronotrope positif de l'ISO et négatif de l'ACh. D'après Di Francesco et al. 1993.	83
Figure 23 A : Courbes I-V des VDCC $Ca_v1.3$, $Ca_v1.2$ et $Ca_v3.1$. B : Courbes d'inactivation des VDCC enregistrées sur cNSA de souris. D'après Mangoni et al., 2006.	89
Figure 24 : Schéma structurel et fonctionnel de $Ca_v1.2$ (a) et $Ca_v1.3$ (b). La sous-unité α_1 est dépliée pour chacun des canaux avec les 4 domaines transmembranaires I-IV et les 6 segments S1-S6 qui les composent. La région du	

pore est entre S5 et S6 et le segment S4 est chargé positivement (****). Les motifs verts sur les S6 indiquent les régions sensibles au voltage. Les variants d'épissage sont surlignés en noir et bleu et en jaune lorsqu'ils différencient $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$. L'épissage différentiel de l'exon 9 est la cause du seuil d'activation plus négatif de $Ca_v1.3$. Le domaine IQ pour la fixation de la CaM est en rouge. Le domaine PDZ de $Ca_v1.3$ permet l'interaction de Densin pour la CaMKII et d'autres protéines comme SHANK qui sont exprimées dans d'autres types cellulaires que des cellules pacemaker. D'après Zucotti et al., 2011. _____ 91

Figure 25 : Images du couplage entre $Ca_v1.3$ et RyR2 sur cNSA. Avec des anticorps anti- $Ca_v1.2$ (A, C, D) ou anti- $Ca_v1.3$ (F, H, I) additionné à un anti-RyR2 (B, G). Les bandes régulières du marquage de $Ca_v1.3$ (F) correspondent au motif marqué du RyR2 (G). D : $Ca_v1.2$ et RyR2 sont co-localisés au niveau de la membrane du sarcolemme. I : $Ca_v1.3$ et RyR2 sont co-localisés sur la membrane du sarcolemme et également sur les structures du sarcomère. Le ratio de co-immunofluorescence entre RyR2 et le LTCC montre une distribution proche entre $Ca_v1.3$ et RyR2 (données non montrées, voir l'article). D'après Christel, Cardona et al. 2012. _____ 92

Figure 26 : Structure de TTCC. D'après Chemin et al. 2017 _____ 93

Figure 27 : Enregistrements ECG de patients atteints de syndrome SANDD. En comparaison d'une personne saine (a), les ECG de trois individus portant la mutation homozygote CACNA1D montrent des anomalies. Les astérisques marquent les ondes P précédant les complexes QRS, les flèches désignent des ondes P coïncidant avec des ondes T. Chez les patients malades, les intervalles P-P et R-R sont variables soulignant une arythmie sinusale. Les numéros indiquent le rythme cardiaque calculé à partir de l'intervalle R-R. D'après SM Baig et al., 2011. ____ 99

Figure 28 : ECG descriptif d'un AVB II avec une prolongation progressive de l'intervalle P-R (Mobitz type II) d'un patient CHB. De Friedman et al. 2003, Images in paediatric cardiology. _____ 99

Figure 29 : Activité cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. (A) : les ECGs enregistrés chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présentent une bradycardie du NSA et des AVBs caractérisés par un intervalle RR (« beat-to-beat » illustré en (B)) plus long et plus variable que chez les WT et le génotype hétérozygote. D'après Platzer et al. 2000. _____ 101

Figure 30 : Paramètres mesurés avec une microélectrode sur le NSA entier de souris WT, hétérozygote $Ca_v1.3^{+/-}$ et homozygote négatif $Ca_v1.3^{-/-}$. DDR : Diastolic depolarization rate ; CL : Cycle length ; MDP : Maximum diastolic potential ; APA : AP amplitude ; V_{max} : Maximum upstroke velocity ; APD : AP duration à 50 ou 80 % de la repolarisation. D'après Zhang, Xu et al. 2002. _____ 102

Figure 31 : Profil électrophysiologique des cNSA de souris $Ca_v1.3^{-/-}$. A : Enregistrements de PAS de cNSA chez WT et $Ca_v1.3^{-/-}$. B&C : Le rythme de l'activité cellulaire est irrégulier à cause de la perte de $Ca_v1.3$ (b) en comparaison avec WT (a). D'après Mangoni et al. 2003. _____ 105

Figure 32 : Activité pacemaker de cNSA de $Ca_v1.3^{-/-}$ et paramètres mesurés en patch clamp. Potentiel de membrane type de cNAVs de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ en condition basale (A) et sous l'injection d'un courant négatif à partir de la flèche (B) qui déclenche des PAS. C : Fréquence de PA en condition contrôle (barres blanches) et sous ISO 0.1 μM (barres noires) des trois génotypes WT, $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v3.1^{-/-}$. D : Effet relatif de l'ISO 0.1 μM en pourcentage de la fréquence de PA. D'après Marger et al., 2011 _____ 106

Figure 33 : Ensemble des caractéristiques de l'activité cardiaque de la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ in vivo et in vitro sur cNSA isolée. (A et B) Les ECG in vivo montrent une légère bradycardie (intervalle RR allongé) chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$ lorsque l'influence du SNA est supprimée en condition ANS- (traitement atropine + propranolol). La délétion de $Ca_v3.1$ induit également un ralentissement de la conduction AV (intervalle PQ allongé). La durée de l'onde P et du complexe QRS reste inchangée. (C) In vitro, l'enregistrement de PAs sur cNSA montre une diminution de la pente de la DD et une diminution de la fréquence de PA à cause de la perte de $Ca_v3.1$ (E et F). La durée des PAs, le potentiel maximum de dépolarisation et le seuil de déclenchement de PA ne sont pas modifiés (G et D). D'après Mangoni et al. 2006 _____ 109

Figure 34 : I_{Ca} dans les cNSA des souris WT (a) et $Ca_v3.1^{-/-}$ (b). La totalité d' I_{Ca} est enregistrée à un potentiel de -90 mV (marques rondes noires) et I_{CaL} à un potentiel de -55 mV. Chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$, le courant total I_{Ca} correspond à I_{CaL} . D'après Mangoni et al. 2006. _____ 110

Figure 35 : Temps de conduction mesurés in vivo chez la souris $Ca_v3.1^{-/-}$. (a) Intervalles de temps mesurés entre la contraction des oreillettes et His (AH) et de His à la contraction des ventricules (HV) sur les ECGs in vivo chez la souris WT (barres blanches) et $Ca_v3.1^{-/-}$ (barres noires). (b) Périodes réfractaires effectives (ERP) des oreillettes (AERP), de la partie atrioventriculaire (AVERP), des ventricules (VERP) et longueur de cycle Wenckebach (Wenck) symbolisant des AVBs. D'après Mangoni et al. 2006. _____ 111

Figure 36 : Comparatif de l'activité cardiaque entre souris simple et double mutantes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les ECG in vivo des différents génotypes montrent une augmentation de l'intervalle RR avec l'addition des mutations en A. Le temps de conduction AV augmente également en B. Le nombre d'ondes P isolées symptomatiques des AVBs est exacerbé avec la double mutation (C). D'après Marger et al. 2011 _____ 113

Figure 37 : Comparatif de l'activité pacemaker des cNAVs entre souris simple et double mutantes $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. Les PAs issus de cNAV WT (A), $Ca_v3.1^{-/-}$ (B), $Ca_v1.3^{-/-}$ (C) et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (D) enregistrés en patch clamp en condition contrôle (gris) et en injectant un courant (noir). (E) La fréquence des PAs (rate, bpm) est réduite chez le $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ en comparaison avec tous les autres génotypes. D'après Marger et al. 2011 _____ 114

Figure 38 : Enregistrements en imagerie confocale de la libération spontanée de Ca^{2+} intracellulaire via le RyR2 dans la cNSA. A : Comparaison des transitoires systoliques calciques et de la distribution des phénomènes de sparks tout au long de la phase diastolique dans des cNSA WT et RyR^{R4496C} . L'ISO (2 nM) accentue ces phénomènes. B : La perfusion additionnelle de caféine (10 mM) décharge le Ca^{2+} contenu dans le RS. La quantité de Ca^{2+} libérée est moindre en cas de surexpression de RyR2. D'après Neco et al. 2012. _____ 116

Figure 39 : Activité du NSA de la souris NCX KO. A : Enregistrements de l'activité en microscopie confocale, configuration « line scan », de la dynamique calcique intracellulaire au niveau du NSA de la souris WT et NCX KO. B : I_{Ca} en présence d'un tampon calcique (BAPTA 1 mM). C : Avec une concentration plus importante en BAPTA (10 mM). D'après Torrente et al. 2015. _____ 117

Figure 40: Effet de l'Apamine. Décharges calciques spontanées enregistrées en line scan sur le tissu sinusal avant et après perfusion de 10 nmol d'Apamine. D'après Torrente, Zhang et al. 2017. _____ 118

<i>Figure 41 : Impact de l'ISO sur le potentiel de membrane de $Ca_v1.3^{-/-}$. A : PA des cNSA WT (noir) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (rouge) en condition contrôle et ISO 2 nM. B : Fréquence de PA. C&D : Pentas de la phase LDD (SLDD) et de l'EDD (SEDD). E : Nombre d'évènement DAD/min. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.</i>	119
<i>Figure 42 A : Imagerie calcique en configuration line scan sur microscope confocal sur cNSA. B : Fluorescence du Ca^{2+} enregistré en fonction du temps, se rapporte à A. C : Valeur de la rampe précédant le transitoire calcique. D et E : Amplitude et pente du transitoire calcique. F, G et H : Amplitude, durée et largeur des phénomènes de LCRs. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.</i>	120
<i>Figure 43 A et B : Imagerie calcique en microscopie confocale dans les cNSAs des souris WT (A) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (B) en condition saturante d'ISO 10 nM. Ces enregistrements montrent que la distribution des sparks calciques est plus éparse chez la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ que chez le WT. D'après Torrente, Mesirca et al. 2016.</i>	121
<i>Figure 44 : Estimation du nombre de cas de SSS par an entre 2012 et 2060 aux Etats unis. D'après Jensen et al., 2014.</i>	125
<i>Figure 45 : Les différentes stratégies innovantes ayant pour but de créer un pacemaker biologique. a : Des adénovirus sont utilisés pour surexprimer directement HCN et réduire $K_{ir2.1}$ dans un cardiomyocyte classique. b : Une approche avec des cellules souches d'origine embryonnaire, pluripotentes implantées autour du myocarde peut créer une région pacemaker. c : On appelle « hybride » l'approche utilisant des cellules humaines de type mésenchymateuse utilisées pour se coupler à un cardiomyocyte par une jonction gap et délivrer les gènes nécessaires à l'expression d'HCN par exemple. d : La reprogrammation de cellules somatiques en cNSA est possible grâce à la surexpression de la T-box de transcription TBX18 via un adénovirus comme dans a. Sauf que la T-box est en amont de l'expression des canaux ioniques. D'après la revue de Cingolani et al., 2018.</i>	128
<i>Figure 46 : Réseau transcriptionnel d'influence déterminant le développement du NSA. D'après J.H. van Weerd et V.M. Christoffels, 2016</i>	130
<i>Figure 47 : Concept de « ciblage compensatoire du canal ». L'automatisme d'une cellule pacemaker est représenté pour chaque génotype, en équilibre chez le WT et pathologique chez le mutant $Ca_v1.3^{-/-}$. Il est normalisé avec la mutation additionnelle de GIRK4 ($GIRK4^{-/-}$). D'après Mangoni et al. 2018.</i>	135
<i>Figure 48 : Système d'acquisition d'électrocardiogramme in vivo. A gauche, une photographie du transmetteur et une radiographie d'un animal implanté. A droite, une illustration du système d'acquisition du signal téléométrique avec une image d'une plateforme réceptrice sur laquelle est disposée une cage avec l'animal. En bas à droite, le système d'acquisition convertit le signal en numérique pour l'analyse de l'ECG sur ECG auto.</i>	143
<i>Figure 49 : Photographie du système Langendorff EMKA.</i>	147
<i>Figure 50 : Photographie d'un cœur perfusé sur le système Langendorff.</i>	148
<i>Figure 51 : Photographie de la préparation tissulaire des oreillettes et du NSA épinglée sur une couche de Sylgard. Modifiée d'après Mangoni et al., 2018.</i>	149

Figure 52 A : Carte d'activation de la préparation du nœud sinusal (souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) mettant en évidence la conduction du signal à partir du foyer de dépolarisation du NSA (rouge) jusqu'aux oreillettes (échelon de couleur : 2 ms). B : Acquisition de l'activité fluorescente enregistrée sur 3 pixels (au niveau du NSA (noir), de l'oreillette droite (rouge) et gauche (bleu) d'un tissu souris WT). _____ 151

Figure 53 : Photographie d'une cNSA isolée. D'après Mangoni et al., 2018. _____ 153

Figure 54 : Schéma de PA de cNSA. MDP : Potentiel maximal de dépolarisation ; APD : Durée du PA ; APA : Amplitude du PA ; LDD : Pente de la phase linéaire de la DD ; EDD : Pente de la phase exponentielle de la DD ; E_{th} : Seuil de déclenchement de PA ; CL : Temps d'un cycle. Modifié d'après Mangoni et al., 2008. _____ 154

Résultat 1 A : Graphiques à points de l'intervalle RR (gauche) et ECGs (droite) de tous les génotypes en condition contrôle. En dessous, l'histogramme montre la fréquence atriale correspondant à l'intervalle PP. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. **B** : Même représentation de l'activité cardiaque après l'injection IP d'Atropine (0.5 mg/kg) + Propranolol (5 mg/kg) qui inhibe le système nerveux autonome (ANS). WT N=10, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=12, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=8. Test: One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons. **C** : Rythme cardiaque avant et après injection d'ISO 0.1 mg/kg. WT N=10, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=11. Test: Two way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test. **D** : Nombre d'AVB par minute en condition contrôle et après l'injection d'Atropine + Propranolol. $Ca_v1.3^{-/-}$ N=6, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. Unpaired t test. # : Par comparaison avec WT. 161

Résultat 2 A : Graphiques à points et ECGs avant et (**B** :) après injection d'IVA 6 mg/kg. **C** : Fréquence cardiaque moyenne avant (gris) et après (bleu) injection d'IVA dans les différents génotypes. WT N=10, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=5, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. **D** : Effet relatif de l'injection de l'IVA sur la fréquence cardiaque en bpm sur tous les génotypes. Test: One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. # : Par comparaison avec WT. ____ 163

Résultat 3 A : Graphiques à points des fréquences atriales en bleu et ventriculaires en orange enregistrés sur un même cœur avec l'ECG correspondant en dessous. **B**, **D** et **E** : Fréquences atriales des cœurs isolés en condition contrôle, sous perfusion d'IVA 10 μ M (+10 min) et d'IVA 10 μ M + TTX 100 nM (+10 min). **C** : Graphique de la variabilité moyenne entre les fréquences atriales et ventriculaires enregistrées sur les cœurs isolés en condition contrôle. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=6, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. Test : One way ANOVA pour A, D, E. Kurskal-Wallis non parametric, Dunn's multiple comparisons test pour C. # : Par comparaison avec WT. _____ 165

Résultat 4 A : Photographie d'une préparation du tissu sinusal isolé en condition contrôle. Cette image sert de référence pour localiser les différents foyers de dépolarisation sur les différents génotypes. Chaque point est le foyer de dépolarisation sur un tissu. Les foyers de dépolarisation liés par une ligne montrent qu'il y a plusieurs foyers sur un même tissu. **B** : Fréquences de dépolarisation et (**C** :) coefficients de variabilité des fréquences de dépolarisation. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. One way ANOVA. **D** : Régression linéaire entre la fréquence de dépolarisation et l'éloignement du foyer de dépolarisation vis à vis de la zone frontale du NSA où est regroupé l'activité dans les tissus WT. **E** : Temps de conduction entre le début de la dépolarisation du foyer et la dépolarisation complète de l'oreillette droite (RA) et gauche (**F** ; LA). # : Par comparaison avec WT. _____ 167

Résultat 5 A : Photographie de la préparation tissulaire du tissu sinusal isolé standard. Les foyers de dépolarisation sont marqués après la perfusion d'IVA 10 μ M pendant 10 min. L'histogramme associé montre la fréquence de dépolarisation des différents génotypes après la perfusion d'IVA 10 μ M. **B :** La même représentation est réalisée sous perfusion d'IVA 10 μ M + TTX 100 nM. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. One-way ANOVA. # : Par comparaison avec WT. _____ 168

Résultat 6 : Exemples d'enregistrement de PA de cNSA des différents génotypes et dans les différentes conditions d'inhibitions, effectués en patch clamp. Les concentrations de TTX et d'IVA sont diminuées par rapport aux expériences ex vivo car les cNSAs isolées sont plus sensibles que les tissus et les cœurs isolés. Les figures à droite montrent les fréquences de PA mesurées dans les cNSAs dans tous les génotypes en condition contrôle, IVA 3 μ M et IVA 3 μ M + TTX 50 nM. En condition contrôle: WT n=14; $Ca_v3.1^{-/-}$ n=8; $Ca_v1.3^{-/-}$ n=6; $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n= 14. _____ 170

Résultat 7 : Les histogrammes de la colonne de gauche montrent les fréquences des transitoires calciques de tous les génotypes dans les 3 conditions : contrôle, IVA 3 μ M et IVA 3 μ M+TTX 50 nM, mesurées en imagerie calcique en microscopie confocale. A droite, les libérations localisées de Ca^{2+} (Sparks/100 μ m/s). WT N=2, n=31; $Ca_v3.1^{-/-}$ N=2, n=23; $Ca_v1.3^{-/-}$ N=2, n=15 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=2, n=11. Kruskal Wallis test, non-parametric. # : Par comparaison avec WT. _____ 172

Résultat 8 A : Fréquences cardiaques (à gauche) et déviation standard (à droite) des fréquences cardiaques enregistrées in vivo en condition contrôle (en haut) et après injection d'A+P (en bas). La fréquence cardiaque est mesurée à partir de l'intervalle RR. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. # : Par comparaison avec le WT. One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. **B :** Intervalles de temps entre l'onde P et l'onde R du complexe QRS à gauche et entre l'onde Q et l'onde T à droite, mesurés sur les ECGs enregistrés in vivo par télémétrie. WT N=11, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=11, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=10. One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. # : En comparaison avec le WT. _____ 175

Résultat 9 : Coefficient de variabilité du rythme de dépolarisation des tissus et temps de conduction du signal provenant du foyer de dépolarisation jusqu'à la dépolarisation complète de l'oreillette droite ou gauche. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. One way ANOVA. _____ 176

Résultat 10 : Tableau des dysfonctionnements de l'activité pacemaker et de la conduction du signal en cartographie optique. WT N=8, $Ca_v3.1^{-/-}$ N=8, $Ca_v1.3^{-/-}$ N=7, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ N=7. Les évolutions des dysfonctions par rapport à la condition précédente sont surlignées en jaune. En condition contrôle, tous les tissus génèrent une activité spontanée au niveau du NSA. Les tissus mutants présentent en majorité des multiple foyers de dépolarisation (la moitié des $Ca_v3.1^{-/-}$, 4 sur 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ et tous les $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$). Quatre tissus présentent des foyers de dépolarisation ectopiques au NSA (1/7 $Ca_v1.3^{-/-}$ et 3/7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) et ne conduisent pas le signal jusqu'à l'oreillette gauche (3/7 $Ca_v1.3^{-/-}$ et 1/7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$). _____ 177

_____ 178

Résultat 11 : Paramètre des PA enregistrés en patch clamp sur cNSAs MDP: Potentiel maximal de dépolarisation (mV), Eth: Seuil de déclenchement d'un PA (mV), APA: amplitude de PA (mV), APD: Durée du PA (ms). Mesure des pentes linéaires (LDD), exponentielle de la DD (EDD) et de la phase de dépolarisation du PA (dV/dt). Les histogrammes et le tableau montrent les mêmes résultats. _____ 178

Résultat 12 A : L'histogramme montre la fréquence de PA de cNSAs WT et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ en condition contrôle et sous perfusion de 2 ou 10 nM d'ISO. La concentration d'ISO 2 nM normalise la concentration en AMPc dans les cellules alors que 100 nM est une concentration saturante qui stimule fortement la production d'AMPc. **B** : Les histogrammes montrent l'évolution des pentes de la DD dans ces mêmes conditions. _____ 179

Résultat 13 : Les histogrammes montrent les amplitudes des transitoires calciques normalisées F/F_0 enregistrées en imagerie calcique sur cNSAs dans tous les génotypes en fonction des conditions. Le dernier histogramme montre l'amplitude des transitoires calciques en fonction des génotypes en condition contrôle. Peu de variations sont relevées. _____ 180

Résultat 14 : Enregistrements ECG de l'activité cardiaque des cœurs perfusés sur le système Langendorff. Les dysfonctions principales relevées sont des ondes P inversées, des extrasystoles ventriculaires (ESV), des rythmes d'échappement ventriculaires et des phases de tachycardie ventriculaire (TV). _____ 181

Résultat 15 : Carte d'activation des tissus des différents génotypes avec un gradient colorimétrique de 4 msec par couleur. Les cartes d'activation du signal électrique dans les tissus sinusaux permettent d'observer le foyer de dépolarisation et le motif de propagation du signal en fonction du temps. Les cartes d'activation de $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ illustrées ci-dessus correspondent à l'activité d'un même tissu pour chaque génotype. Elles montrent le phénomène de multiple foyer de dépolarisation au sein d'un même tissu. _____ 182

Résultat 16 : Fluorescence calcique enregistrée en microscopie confocale sur des cNSAs marquées au CAL520. Images analysées sur ImageJ et tracés de l'activité reportés sur Clampfit. Les transitoires calciques (bandes) se distinguent facilement sur l'image et le tracé alors que les sparks (points) sont plus petits. _____ 183

Références bibliographiques

- Alvarez, J. L., L. S. Rubio and G. Vassort (1996). "Facilitation of T-type calcium current in bullfrog atrial cells: voltage-dependent relief of a G protein inhibitory tone." J Physiol **491 (Pt 2)**: 321-334.
- Anderson, J. B. and D. W. Benson (2010). "Genetics of Sick Sinus Syndrome." Card Electrophysiol Clin **2(4)**: 499-507.
- Arbelo, E. and J. Brugada (2014). "Risk stratification and treatment of brugada syndrome." Curr Cardiol Rep **16(7)**: 508.
- Arsic, N., D. Mamaeva, N. J. Lamb and A. Fernandez (2008). "Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages." Exp Cell Res **314(6)**: 1266-1280.
- Baig, S. M., A. Koschak, A. Lieb, M. Gebhart, C. Dafinger, G. Nurnberg, A. Ali, I. Ahmad, M. J. Sinnegger-Brauns, N. Brandt, J. Engel, M. E. Mangoni, M. Farooq, H. U. Khan, P. Nurnberg, J. Striessnig and H. J. Bolz (2011). "Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness." Nat Neurosci **14(1)**: 77-84.
- Baruscotti, M., A. Bucchi, R. Milanesi, M. Paina, A. Barbuti, T. Gneccchi-Ruscione, E. Bianco, L. Vitali-Serdoz, R. Cappato and D. DiFrancesco (2017). "A gain-of-function mutation in the cardiac pacemaker HCN4 channel increasing cAMP sensitivity is associated with familial Inappropriate Sinus Tachycardia." Eur Heart J **38(4)**: 280-288.
- Baruscotti, M., D. DiFrancesco and R. B. Robinson (1996). "A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells." J Physiol **492 (Pt 1)**: 21-30.
- Bean, B. P. (1985). "Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology." J Gen Physiol **86(1)**: 1-30.
- Bers, D. M. (2004). "Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function." J Mol Cell Cardiol **37(2)**: 417-429.
- Biel, M., A. Schneider and C. Wahl (2002). "Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation." Trends Cardiovasc Med **12(5)**: 206-212.
- Billette, J. (2002). "What is the atrioventricular node? Some clues in sorting out its structure-function relationship." J Cardiovasc Electrophysiol **13(5)**: 515-518.
- Bogdanov, K. Y., T. M. Vinogradova and E. G. Lakatta (2001). "Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation." Circ Res **88(12)**: 1254-1258.
- Boink, G. J., L. Duan, B. D. Nearing, I. N. Shlapakova, E. A. Sosunov, E. P. Anyukhovskiy, E. Bobkov, Y. Kryukova, N. Ozgen, P. Danilo, Jr., I. S. Cohen, R. L. Verrier, R. B. Robinson and M. R. Rosen (2013). "HCN2/SKM1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomically responsive biological pacing at physiological heart rates." J Am Coll Cardiol **61(11)**: 1192-1201.
- Bois, P., J. Bescond, B. Renaudon and J. Lenfant (1996). "Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells." Br J Pharmacol **118(4)**: 1051-1057.
- Boyett, M. R. (1981). "A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in sheep cardiac Purkinje fibres." J Physiol **319**: 1-22.
- Boyett, M. R., H. Honjo and I. Kodama (2000). "The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure." Cardiovasc Res **47(4)**: 658-687.

Brown, H., D. DiFrancesco and S. Noble (1979). "Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters." J Exp Biol **81**: 175-204.

Brown, H. F., D. DiFrancesco and S. J. Noble (1979). "How does adrenaline accelerate the heart?" Nature **280**(5719): 235-236.

Bucchi, A., M. Baruscotti and D. DiFrancesco (2002). "Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine." J Gen Physiol **120**(1): 1-13.

Buraei, Z. and J. Yang (2013). "Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca₂(⁺) channels." Biochim Biophys Acta **1828**(7): 1530-1540.

Cacheaux, L. P., N. Topf, G. R. Tibbs, U. R. Schaefer, R. Levi, N. L. Harrison, G. W. Abbott and P. A. Goldstein (2005). "Impairment of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel function by the intravenous general anesthetic propofol." J Pharmacol Exp Ther **315**(2): 517-525.

Cameliet, E. (1980). "Decrease of K efflux and influx by external Cs ions in cardiac Purkinje and muscle cells." Pflugers Arch **383**(2): 143-150.

Carbone, E. and H. D. Lux (1987). "Kinetics and Selectivity of a Low-Voltage-Activated Calcium Current in Chick and Rat Sensory Neurons." Journal of Physiology-London **386**: 547-570.

Carmeliet, E. E. (1961). "Chloride ions and the membrane potential of Purkinje fibres." J Physiol **156**: 375-388.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca₂⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.

Cazade, M., I. Bidaud, P. Lory and J. Chemin (2017). "Activity-dependent regulation of T-type calcium channels by submembrane calcium ions." Elife **6**.

Chandler, N. J., I. D. Greener, J. O. Tellez, S. Inada, H. Musa, P. Molenaar, D. DiFrancesco, M. Baruscotti, R. Longhi, R. H. Anderson, R. Billeter, V. Sharma, D. C. Sigg, M. R. Boyett and H. Dobrzynski (2009). "Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker." Circulation **119**(12): 1562-1575.

Chauveau, S., E. P. Anyukhovskiy, M. Ben-Ari, S. Naor, Y. P. Jiang, P. Danilo, T. Rahim, S. Burke, X. L. Qiu, I. A. Potapova, S. V. Doronin, P. R. Brink, O. Binah, I. S. Cohen and M. R. Rosen (2017). "Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Provide In Vivo Biological Pacemaker Function." Circulation-Arrhythmia and Electrophysiology **10**(5).

Chemin, J., M. Cazade and P. Lory (2014). "Modulation of T-type calcium channels by bioactive lipids." Pflugers Arch **466**(4): 689-700.

Chemin, J., A. Monteil, C. Briquaire, S. Richard, E. Perez-Reyes, J. Nargeot and P. Lory (2000). "Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation." FEBS Lett **478**(1-2): 166-172.

Chemin, J., V. Taiakina, A. Monteil, M. Piazza, W. Guan, R. F. Stephens, A. Kitmitto, Z. P. Pang, A. C. Dolphin, E. Perez-Reyes, T. Dieckmann, J. G. Guillemette and J. D. Spafford (2017). "Calmodulin regulates Cav3 T-type channels at their gating brake." J Biol Chem **292**(49): 20010-20031.

Chemin, J., A. Traboulsie and P. Lory (2006). "Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones." Cell Calcium **40**(2): 121-134.

Cho, H. C., Y. Kashiwakura and E. Marban (2007). "Creation of a biological pacemaker by cell fusion." Circ Res **100**(8): 1112-1115.

Christel, C. and A. Lee (2012). "Ca₂⁺-dependent modulation of voltage-gated Ca₂⁺ channels." Biochim Biophys Acta **1820**(8): 1243-1252.

Christel, C. J., N. Cardona, P. Mesirca, S. Herrmann, F. Hofmann, J. Striessnig, A. Ludwig, M. E. Mangoni and A. Lee (2012). "Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node." *J Physiol* **590**(Pt 24): 6327-6342.

Christel, C. J., N. Cardona, P. Mesirca, S. Herrmann, F. Hofmann, J. Striessnig, A. Ludwig, M. E. Mangoni and A. Lee (2012). "Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node." *J Physiol* **590**(24): 6327-6342.

Chun, K. J., J. K. Hwang, S. R. Choi, S. J. Park, Y. K. On, J. S. Kim and K. M. Park (2016). "Electrocardiogram PR Interval Is a Surrogate Marker to Predict New Occurrence of Atrial Fibrillation in Patients with Frequent Premature Atrial Contractions." *J Korean Med Sci* **31**(4): 519-524.

Cingolani, E., J. I. Goldhaber and E. Marban (2018). "Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers." *Nat Rev Cardiol* **15**(3): 139-150.

Coppen, S. R., I. Kodama, M. R. Boyett, H. Dobrzynski, Y. Takagishi, H. Honjo, H. I. Yeh and N. J. Severs (1999). "Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border." *J Histochem Cytochem* **47**(7): 907-918.

Coraboeuf, E., E. Deroubaix and A. Coulombe (1979). "Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart." *Am J Physiol* **236**(4): H561-567.

Cribbs, L. L., B. L. Martin, E. A. Schroder, B. B. Keller, B. P. Delisle and J. Satin (2001). "Identification of the t-type calcium channel (Ca_v3.1d) in developing mouse heart." *Circ Res* **88**(4): 403-407.

DiFrancesco, D. (1981). "A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres." *J Physiol* **314**: 359-376.

DiFrancesco, D. (1982). "Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium." *J Physiol* **329**: 485-507.

DiFrancesco, D. (1985). "The cardiac hyperpolarizing-activated current, *I_f*. Origins and developments." *Prog Biophys Mol Biol* **46**(3): 163-183.

DiFrancesco, D. (1993). "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue." *Annu Rev Physiol* **55**: 455-472.

DiFrancesco, D. (2010). "The role of the funny current in pacemaker activity." *Circ Res* **106**(3): 434-446.

DiFrancesco, D., P. Ducouret and R. B. Robinson (1989). "Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations." *Science* **243**(4891): 669-671.

DiFrancesco, D. and M. Mangoni (1994). "Modulation of single hyperpolarization-activated channels (*I_f*) by cAMP in the rabbit sino-atrial node." *J Physiol* **474**(3): 473-482.

DiFrancesco, D. and D. Noble (1985). "A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **307**(1133): 353-398.

DiFrancesco, D., F. Porciatti, D. Janigro, G. Maccaferri, M. Mangoni, T. Tritella, F. Chang and I. S. Cohen (1991). "Block of the cardiac pacemaker current (*I_f*) in the rabbit sino-atrial node and in canine Purkinje fibres by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine." *Pflugers Arch* **417**(6): 611-615.

DiFrancesco, D. and P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." *Nature* **351**(6322): 145-147.

DiFrancesco, D. and C. Tromba (1988). "Inhibition of the hyperpolarization-activated current (*I_f*) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes." *J Physiol* **405**: 477-491.

DiFrancesco, D. and C. Tromba (1988). "Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (*I_f*) in rabbit sino-atrial node myocytes." *J Physiol* **405**: 493-510.

Dobrzynski, H., M. R. Boyett and R. H. Anderson (2007). "New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome." *Circulation* **115**(14): 1921-1932.

Dobrzynski, H., J. Li, J. Tellez, I. D. Greener, V. P. Nikolski, S. E. Wright, S. H. Parson, S. A. Jones, M. K. Lancaster, M. Yamamoto, H. Honjo, Y. Takagishi, I. Kodama, I. R. Efimov, R. Billeter and M. R. Boyett (2005). "Computer Three-Dimensional Reconstruction of the Sinoatrial Node." *Circulation*.

Dolphin, A. C. (1996). "Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells." *Trends Neurosci* **19**(1): 35-43.

Edelberg, J. M., W. C. Aird and R. D. Rosenberg (1998). "Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA." *J Clin Invest* **101**(2): 337-343.

Edelberg, J. M., D. T. Huang, M. E. Josephson and R. D. Rosenberg (2001). "Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy." *Heart* **86**(5): 559-562.

Eden, M., B. Meder, M. Volkens, M. Poomvanicha, K. Domes, M. Branchereau, P. Marck, R. Will, A. Bernt, A. Rangrez, M. Busch, C. German Mouse Clinic, M. Hrabe de Angelis, C. Heymes, W. Rottbauer, P. Most, F. Hofmann and N. Frey (2016). "Myoscape controls cardiac calcium cycling and contractility via regulation of L-type calcium channel surface expression." *Nat Commun* **7**: 11317.

Efimov, I. R., G. J. Fahy, Y. Cheng, D. R. Van Wagoner, P. J. Tchou and T. N. Mazgalev (1997). "High-resolution fluorescent imaging does not reveal a distinct atrioventricular nodal anterior input channel (fast pathway) in the rabbit heart during sinus rhythm." *J Cardiovasc Electrophysiol* **8**(3): 295-306.

Efimov, I. R. and T. N. Mazgalev (1998). "High-resolution, three-dimensional fluorescent imaging reveals multilayer conduction pattern in the atrioventricular node." *Circulation* **98**(1): 54-57.

Efimov, I. R., V. P. Nikolski, F. Rothenberg, I. D. Greener, J. Li, H. Dobrzynski and M. Boyett (2004). "Structure-function relationship in the AV junction." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **280**(2): 952-965.

Fermini, B. and R. D. Nathan (1991). "Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes." *Am J Physiol* **260**(3 Pt 2): H735-743.

Ferron, L., V. Capuano, E. Deroubaix, A. Coulombe and J. F. Renaud (2002). "Functional and molecular characterization of a T-type Ca(2+) channel during fetal and postnatal rat heart development." *J Mol Cell Cardiol* **34**(5): 533-546.

Fox, K., I. Ford, P. G. Steg, M. Tendera and R. Ferrari (2008). "Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* **372**(9641): 807-816.

Ganitkevich, V. and G. Isenberg (1991). "Stimulation-induced potentiation of T-type Ca²⁺ channel currents in myocytes from guinea-pig coronary artery." *J Physiol* **443**: 703-725.

Garnier, D., O. Rougier, Y. M. Gargouil and E. Coraboeuf (1969). "[Electrophysiological analysis of myocard membrane properties during the plateau of the action potential, existence of a slow inward current in solutions without divalent ions]." *Pflugers Arch* **313**(4): 321-342.

Giles, W. and E. Shibata (1981). "Autonomic transmitter actions on cardiac pacemaker tissue: a brief review." *Fed Proc* **40**(11): 2618-2624.

Glukhov, A. V., V. V. Fedorov, M. E. Anderson, P. J. Mohler and I. R. Efimov (2010). "Functional anatomy of the murine sinus node: high-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(2): H482-491.

Greenspon, A. J., J. D. Patel, E. Lau, J. A. Ochoa, D. R. Frisch, R. T. Ho, B. B. Pavri and S. M. Kurtz (2012). "Trends in permanent pacemaker implantation in the United States from 1993 to 2009: increasing complexity of patients and procedures." *J Am Coll Cardiol* **60**(16): 1540-1545.

Hall, A. E., O. F. Hutter and D. Noble (1963). "Current-voltage relations of Purkinje fibres in sodium-deficient solutions." J Physiol **166**: 225-240.

Hall, A. E. and D. Noble (1963). "Transient Responses of Purkinje Fibres to Non-Uniform Currents." Nature **199**: 1294-1295.

Han, X., L. Kobzik, D. Severson and Y. Shimoni (1998). "Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node." J Physiol **509 (Pt 3)**: 741-754.

Han, X., Y. Shimoni and W. R. Giles (1994). "An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate." J Physiol **476(2)**: 309-314.

Han, X., Y. Shimoni and W. R. Giles (1995). "A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate." J Gen Physiol **106(1)**: 45-65.

Harzheim, D., K. H. Pfeiffer, L. Fabritz, E. Kremmer, T. Buch, A. Waisman, P. Kirchhof, U. B. Kaupp and R. Seifert (2008). "Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP." Embo J **27(4)**: 692-703.

Haufe, V., J. M. Cordeiro, T. Zimmer, Y. S. Wu, S. Schiccitano, K. Benndorf and R. Dumaine (2005). "Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I_{Na} is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles." Cardiovasc Res **65(1)**: 117-127.

Hauswirth, O., D. Noble and R. W. Tsien (1972). "Separation of the pace-maker and plateau components of delayed rectification in cardiac Purkinje fibres." J Physiol **225(1)**: 211-235.

Hu, Y. F., J. F. Dawkins, H. C. Cho, E. Marban and E. Cingolani (2014). "Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block." Sci Transl Med **6(245)**: 245ra294.

Huser, J., L. A. Blatter and S. L. Lipsius (2000). "Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells." J Physiol **524 Pt 2**: 415-422.

Hutter, O. F. and D. Noble (1960). "Rectifying properties of heart muscle." Nature **188**: 495.

Irisawa, H., H. F. Brown and W. Giles (1993). "Cardiac pacemaking in the sinoatrial node." Physiol Rev **73(1)**: 197-227.

Isenberg, G. (1976). "Cardiac Purkinje fibers: cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents." Pflugers Arch **365(2-3)**: 99-106.

Ishii, T. M., M. Takano, L. H. Xie, A. Noma and H. Ohmori (1999). "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node." Journal of Biological Chemistry **274(18)**: 12835-12839.

Joyner, R. W. and F. J. van Capelle (1986). "Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium." Biophys J **50(6)**: 1157-1164.

Kapoor, N., W. Liang, E. Marban and H. C. Cho (2013). "Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18." Nat Biotechnol **31(1)**: 54-62.

Kenyon, J. L. and W. R. Gibbons (1979). "4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers." J Gen Physiol **73(2)**: 139-157.

Kim, D., I. Song, S. Keum, T. Lee, M. J. Jeong, S. S. Kim, M. W. McEnery and H. S. Shin (2001). "Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking $\alpha(1G)$ T-type Ca^{2+} channels." Neuron **31(1)**: 35-45.

Kleber, A. G. and Y. Rudy (2004). "Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias." Physiol Rev **84(2)**: 431-488.

Knaus, A., X. Zong, N. Beetz, R. Jahns, M. J. Lohse, M. Biel and L. Hein (2007). "Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine." Circulation **115**(7): 872-880.

Lakatta, E. G. and D. DiFrancesco (2009). "What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both?" J Mol Cell Cardiol **47**(2): 157-170.

Lande, G., S. Demolombe, A. Bammert, A. Moorman, F. Charpentier and D. Escande (2001). "Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: Pharmacological profile." Cardiovasc Res **50**(2): 328-334.

Le Quang, K., B. Benito, P. Naud, X. Y. Qi, Y. F. Shi, J. C. Tardif, M. A. Gillis, D. Dobrev, F. Charpentier and S. Nattel (2013). "T-type calcium current contributes to escape automaticity and governs the occurrence of lethal arrhythmias after atrioventricular block in mice." Circ Arrhythm Electrophysiol **6**(4): 799-808.

Lei, M., S. A. Jones, J. Liu, M. K. Lancaster, S. S. Fung, H. Dobrzynski, P. Camelliti, S. K. Maier, D. Noble and M. R. Boyett (2004). "Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking." J Physiol **559**(Pt 3): 835-848.

Li, C. H., Q. Zhang, B. Teng, S. J. Mustafa, J. Y. Huang and H. G. Yu (2008). "Src tyrosine kinase alters gating of hyperpolarization-activated HCN4 pacemaker channel through Tyr531." Am J Physiol Cell Physiol **294**(1): C355-362.

Li, J., I. D. Greener, S. Inada, V. P. Nikolski, M. Yamamoto, J. C. Hancox, H. Zhang, R. Billeter, I. R. Efimov, H. Dobrzynski and M. R. Boyett (2008). "Computer Three-Dimensional Reconstruction of the Atrioventricular Node." Circ Res.

Li, J., J. Qu and R. D. Nathan (1997). "Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node." Am J Physiol **273**(5 Pt 2): H2481-2489.

Li, Y., F. Wang, X. Zhang, Z. Qi, M. Tang, C. Szeto, H. Zhang and X. Chen (2012). "beta-Adrenergic stimulation increases Cav3.1 activity in cardiac myocytes through protein kinase A." PLoS One **7**(7): e39965.

Li, Y., X. Zhang, C. Zhang, X. Zhang, Y. Li, Z. Qi, C. Szeto, M. Tang, Y. Peng, J. D. Molkentin, S. R. Houser, M. Xie and X. Chen (2017). "Increasing T-type calcium channel activity by beta-adrenergic stimulation contributes to beta-adrenergic regulation of heart rates." J Physiol.

Liao, Z., D. Lockhead, E. D. Larson and C. Proenza (2010). "Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node." J Gen Physiol **136**(3): 247-258.

Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K. R. Chien, A. Konnerth, H. C. Pape, M. Biel and F. Hofmann (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2." Embo J **22**(2): 216-224.

Ludwig, A., X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann and M. Biel (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." Nature **393**(6685): 587-591.

Ludwig, A., X. Zong, J. Stieber, R. Hullin, F. Hofmann and M. Biel (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." Embo J **18**(9): 2323-2329.

Maier, S. K., R. E. Westenbroek, T. T. Yamanushi, H. Dobrzynski, M. R. Boyett, W. A. Catterall and T. Scheuer (2003). "An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3507-3512.

Mangoni, M. E., B. Couette, E. Bourinet, J. Platzter, D. Reimer, J. Striessnig and J. Nargeot (2003). "Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5543-5548.

Mangoni, M. E., B. Couette, L. Marger, E. Bourinet, J. Striessnig and J. Nargeot (2006). "Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes." Prog Biophys Mol Biol **90**(1-3): 38-63.

Mangoni, M. E. and J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." Physiol Rev **88**(3): 919-982.

Marger, L., P. Mesirca, J. Alig, A. Torrente, S. Dubel, B. Engeland, S. Kanani, P. Fontanaud, J. Striessnig, H. S. Shin, D. Isbrandt, H. Ehmke, J. Nargeot and M. E. Mangoni (2011). "Functional roles of Ca(v)1.3, Ca(v)3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: insights into the atrioventricular pacemaker mechanism." Channels (Austin) **5**(3): 251-261.

Marger, L., P. Mesirca, J. Alig, A. Torrente, S. Dubel, B. Engeland, S. Kanani, P. Fontanaud, J. Striessnig, H. S. Shin, D. Isbrandt, H. Ehmke, J. Nargeot and M. E. Mangoni (2011). "Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells." Channels (Austin) **5**(3): 241-250.

Marionneau, C., B. Couette, J. Liu, H. Li, M. E. Mangoni, J. Nargeot, M. Lei, D. Escande and S. Demolombe (2005). "Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart." J Physiol **562**(Pt 1): 223-234.

Masson-Pevet, M., W. K. Bleeker, A. J. Mackaay, L. N. Bouman and J. M. Houtkooper (1979). "Sinus node and atrium cells from the rabbit heart: a quantitative electron microscopic description after electrophysiological localization." J Mol Cell Cardiol **11**(6): 555-568.

Matthes, J., L. Yildirim, G. Wietzorrek, D. Reimer, J. Striessnig and S. Herzig (2004). "Disturbed atrio-ventricular conduction and normal contractile function in isolated hearts from Cav1.3-knockout mice." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(6): 554-562.

McAllister, R. E., D. Noble and R. W. Tsien (1975). "Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres." J Physiol **251**(1): 1-59.

Mesirca, P., J. Alig, A. G. Torrente, J. C. Muller, L. Marger, A. Rollin, C. Marquilly, A. Vincent, S. Dubel, I. Bidaud, A. Fernandez, A. Seniuk, B. Engeland, J. Singh, L. Miquerol, H. Ehmke, T. Eschenhagen, J. Nargeot, K. Wickman, D. Isbrandt and M. E. Mangoni (2014). "Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of 'funny' (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation." Nat Commun **5**: 4664.

Mesirca, P., I. Bidaud, F. Briec, S. Evain, A. G. Torrente, K. Le Quang, A. L. Leoni, M. Baudot, L. Marger, A. Chung You Chong, J. Nargeot, J. Striessnig, K. Wickman, F. Charpentier and M. E. Mangoni (2016). "G protein-gated IK_{ACh} channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(7): E932-941.

Miake, J., E. Marban and H. B. Nuss (2002). "Biological pacemaker created by gene transfer." Nature **419**(6903): 132-133.

Milanesi, R., M. Baruscotti, T. Gneccchi-Ruscione and D. DiFrancesco (2006). "Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel." N Engl J Med **354**(2): 151-157.

Mistrik, P., R. Mader, S. Michalakis, M. Weidinger, A. Pfeifer and M. Biel (2005). "The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides." J Biol Chem **280**(29): 27056-27061.

Monfredi, O., H. Dobrzynski, T. Mondal, M. R. Boyett and G. M. Morris (2010). "The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review." Pacing Clin Electrophysiol **33**(11): 1392-1406.

Monteil, A., J. Chemin, E. Bourinet, G. Mennessier, P. Lory and J. Nargeot (2000). "Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels." J Biol Chem **275**(9): 6090-6100.

Moosmang, S., J. Stieber, X. Zong, M. Biel, F. Hofmann and A. Ludwig (2001). "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." Eur J Biochem **268**(6): 1646-1652.

Moroni, A., A. Barbuti, C. Altomare, C. Viscomi, J. Morgan, M. Baruscotti and D. DiFrancesco (2000). "Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel." Pflugers Arch **439**(5): 618-626.

Nawathe, P. A., Y. Kryukova, R. V. Oren, R. Milanesi, C. E. Clancy, J. T. Lu, A. J. Moss, D. DiFrancesco and R. B. Robinson (2013). "An LQTS6 MiRP1 mutation suppresses pacemaker current and is associated with sinus bradycardia." J Cardiovasc Electrophysiol **24**(9): 1021-1027.

Neco, P., A. G. Torrente, P. Mesirca, E. Zorio, N. Liu, S. G. Priori, C. Napolitano, S. Richard, J. P. Benitah, M. E. Mangoni and A. M. Gomez (2012). "Paradoxical effect of increased diastolic Ca(2+) release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circulation **126**(4): 392-401.

Niedergerke, R. (1963). "Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart." J Physiol **167**: 551-580.

Niedergerke, R. (1963). "Movements of Ca in Frog Heart Ventricles at Rest and during Contractures." J Physiol **167**: 515-550.

Niedergerke, R. and R. K. Orkand (1966). "The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart." J Physiol **184**(2): 291-311.

Nilius, B., P. Hess, J. B. Lansman and R. W. Tsien (1985). "A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells." Nature **316**(6027): 443-446.

Niwa, N., K. Yasui, T. Opthof, H. Takemura, A. Shimizu, M. Horiba, J. K. Lee, H. Honjo, K. Kamiya and I. Kodama (2004). "Cav3.2 subunit underlies the functional T-type Ca2+ channel in murine hearts during the embryonic period." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2257-2263.

Noble, D. and R. W. Tsien (1969). "Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres." J Physiol **200**(1): 205-231.

Noble, D. and R. W. Tsien (1969). "Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibres based on voltage clamp measurements of membrane current." J Physiol **200**(1): 233-254.

Noma, A., H. Irisawa, S. Kokobun, H. Kotake, M. Nishimura and Y. Watanabe (1980). "Slow current systems in the A-V node of the rabbit heart." Nature **285**(5762): 228-229.

Noma, A., H. Kotake and H. Irisawa (1980). "Slow inward current and its role mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit sinoatrial node." Pflugers Arch **388**(1): 1-9.

Noma, A., M. Morad and H. Irisawa (1983). "Does the "pacemaker current" generate the diastolic depolarization in the rabbit SA node cells?" Pflugers Arch **397**(3): 190-194.

Opthof, T. (1988). "The mammalian sinoatrial node." Cardiovasc Drugs Ther **1**(6): 573-597.

Papadatos, G. A., P. M. Wallerstein, C. E. Head, R. Ratcliff, P. A. Brady, K. Benndorf, R. C. Saumarez, A. E. Trezise, C. L. Huang, J. I. Vandenberg, W. H. Colledge and A. A. Grace (2002). "Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6210-6215.

Perez-Reyes, E. (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels." Physiol Rev **83**(1): 117-161.

Pian, P., A. Bucchi, R. B. Robinson and S. A. Siegelbaum (2006). "Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2." *J Gen Physiol* **128**(5): 593-604.

Pietro Mesirca, I. B., François Briecd, Stéphane Evaind, Angelo G. Torrenteab,c, Khai Le Quangd,e,, M. B. Anne-Laure Leonib, b,c, Laurine Margera,b,c, Antony Chung You Chonga,b,c, Joël Nargeota,b,c, and K. W. Joerg Striessnigf, Flavien Charpentierd,e,h,i,2, and Matteo E. Mangonia,b,c,1,2 (2015). "G protein-gated IKACH channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block." *PNAS*.

Platzer, J., J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng and J. Striessnig (2000). "Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels." *Cell* **102**(1): 89-97.

Plotnikov, A. N., I. Shlapakova, M. J. Szabolcs, P. Danilo, Jr., B. H. Lorell, I. A. Potapova, Z. Lu, A. B. Rosen, R. T. Mathias, P. R. Brink, R. B. Robinson, I. S. Cohen and M. R. Rosen (2007). "Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart." *Circulation* **116**(7): 706-713.

Protze, S. I., J. Liu, U. Nussinovitch, L. Ohana, P. H. Backx, L. Gepstein and G. M. Keller (2017). "Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker." *Nat Biotechnol* **35**(1): 56-68.

Publicover, S. J., M. R. Preston and A. J. El Haj (1995). "Voltage-dependent potentiation of low-voltage-activated Ca²⁺ channel currents in cultured rat bone marrow cells." *J Physiol* **489 (Pt 3)**: 649-661.

Qu, J., A. N. Plotnikov, P. Danilo, Jr., I. Shlapakova, I. S. Cohen, R. B. Robinson and M. R. Rosen (2003). "Expression and function of a biological pacemaker in canine heart." *Circulation* **107**(8): 1106-1109.

Qu, Y., G. Baroudi, Y. Yue and M. Boutjdir (2005). "Novel molecular mechanism involving alpha1D (Cav1.3) L-type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia." *Circulation* **111**(23): 3034-3041.

Reuter, H. (1967). "The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration." *J Physiol* **192**(2): 479-492.

Robinson, R. B., H. Yu, F. Chang and I. S. Cohen (1997). "Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, if, in rat ventricle cells." *Pflugers Arch* **433**(4): 533-535.

Rosen, M. R., P. R. Brink, I. S. Cohen and R. B. Robinson (2004). "Genes, stem cells and biological pacemakers." *Cardiovasc Res* **64**(1): 12-23.

Rubenstein, D. S. and S. L. Lipsius (1989). "Mechanisms of automaticity in subsidiary pacemakers from cat right atrium." *Circ Res* **64**(4): 648-657.

Saito, Y., K. Nakamura and H. Ito (2018). "Cell-based Biological Pacemakers: Progress and Problems." *Acta Med Okayama* **72**(1): 1-7.

Saito, Y., K. Nakamura, M. Yoshida, H. Sugiyama, T. Ohe, J. Kurokawa, T. Furukawa, M. Takano, S. Nagase, H. Morita, K. F. Kusano and H. Ito (2015). "Enhancement of Spontaneous Activity by HCN4 Overexpression in Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes - A Possible Biological Pacemaker." *PLoS One* **10**(9): e0138193.

Saito, Y., K. Nakamura, M. Yoshida, H. Sugiyama, M. Takano, S. Nagase, H. Morita, K. F. Kusano and H. Ito (2018). "HCN4-Overexpressing Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Generate a New Rapid Rhythm in Rats with Bradycardia." *Int Heart J* **59**(3): 601-606.

Sakmann, B. and E. Neher (1984). "Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes." *Annu Rev Physiol* **46**: 455-472.

Santoro, B., D. T. Liu, H. Yao, D. Bartsch, E. R. Kandel, S. A. Siegelbaum and G. R. Tibbs (1998). "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." Cell **93**(5): 717-729.

Santoro, B., B. J. Wainger and S. A. Siegelbaum (2004). "Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction." J Neurosci **24**(47): 10750-10762.

Santulli, G., D. R. Lewis and A. R. Marks (2017). "Physiology and pathophysiology of excitation-contraction coupling: the functional role of ryanodine receptor." J Muscle Res Cell Motil **38**(1): 37-45.

Schulze-Bahr, E., A. Neu, P. Friederich, U. B. Kaupp, G. Breithardt, O. Pongs and D. Isbrandt (2003). "Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease." J Clin Invest **111**(10): 1537-1545.

Shi, W., R. Wymore, H. Yu, J. Wu, R. T. Wymore, Z. Pan, R. B. Robinson, J. E. Dixon, D. McKinnon and I. S. Cohen (1999). "Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues." Circ Res **85**(1): e1-6.

Shimoni, Y., X. Han, D. Severson and W. R. Giles (1996). "Mediation by nitric oxide of the indirect effects of adenosine on calcium current in rabbit heart pacemaker cells." Br J Pharmacol **119**(7): 1463-1469.

Sinnegger-Brauns, M. J., A. Hetzenauer, I. G. Huber, E. Renstrom, G. Wietzorrek, S. Berjukov, M. Cavalli, D. Walter, A. Koschak, R. Waldschutz, S. Hering, S. Bova, P. Rorsman, O. Pongs, N. Singewald and J. J. Striessnig (2004). "Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels." J Clin Invest **113**(10): 1430-1439.

Stephenson, R. S., A. Atkinson, P. Kottas, F. Perde, F. Jafarzadeh, M. Bateman, P. A. Iaizzo, J. Zhao, H. Zhang, R. H. Anderson, J. C. Jarvis and H. Dobrzynski (2017). "High resolution 3-Dimensional imaging of the human cardiac conduction system from microanatomy to mathematical modeling." Sci Rep **7**(1): 7188.

Stieber, J., S. Herrmann, S. Feil, J. Loster, R. Feil, M. Biel, F. Hofmann and A. Ludwig (2003). "The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15235-15240.

Strandberg, L. S., X. Cui, A. Rath, J. Liu, E. D. Silverman, X. Liu, V. Siragam, C. Ackerley, B. B. Su, J. Y. Yan, M. Capecci, L. Biavati, A. Accorroni, W. Yuen, F. Quattrone, K. Lung, E. T. Jaeggi, P. H. Backx, C. M. Deber and R. M. Hamilton (2013). "Congenital heart block maternal sera autoantibodies target an extracellular epitope on the alpha1G T-type calcium channel in human fetal hearts." PLoS One **8**(9): e72668.

Tadross, M. R., M. Ben Johny and D. T. Yue (2010). "Molecular endpoints of Ca²⁺/calmodulin- and voltage-dependent inactivation of Ca(v)1.3 channels." J Gen Physiol **135**(3): 197-215.

Talavera, K. and B. Nilius (2006). "Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca²⁺ channels." Cell Calcium **40**(2): 97-114.

Tellez, J. O., H. Dobrzynski, I. D. Greener, G. M. Graham, E. Laing, H. Honjo, S. J. Hubbard, M. R. Boyett and R. Billeter (2006). "Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit." Circ Res **99**(12): 1384-1393.

Torrente, A. G. (2015). "Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice." PNAS.

Torrente, A. G., P. Mesirca, P. Neco, R. Rizzetto, S. Dubel, C. Barrere, M. Sinegger-Brauns, J. Striessnig, S. Richard, J. Nargeot, A. M. Gomez and M. E. Mangoni (2016). "L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca²⁺ release during sino-atrial node pacemaker activity." Cardiovasc Res **109**(3): 451-461.

Torrente, A. G., R. Zhang, H. Wang, A. Zaini, B. Kim, X. Yue, K. D. Philipson and J. I. Goldhaber (2017). "Contribution of small conductance K(+) channels to sinoatrial node pacemaker activity: insights from atrial-specific Na(+) /Ca(2+) exchange knockout mice." J Physiol **595**(12): 3847-3865.

Toyoda, F., P. Mesirca, S. Dubel, W. G. Ding, J. Striessnig, M. E. Mangoni and H. Matsuura (2017). "CaV1.3 L-type Ca(2+) channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na(+) current." Sci Rep **7**(1): 7869.

Tse, G., C. W. Wong, M. Q. Gong, L. Meng, K. P. Letsas, G. P. Li, P. Whittaker, A. Bhardwaj, A. C. Sawant, W. K. Wu, S. H. Wong, J. Shenthara, L. A. Tse, M. C. Wong, A. Baranchuk, G. X. Yan, T. Liu and N. International Health Informatics Study (2017). "Meta-analysis of T-wave indices for risk stratification in myocardial infarction." J Geriatr Cardiol **14**(12): 776-779.

Tsien, R. W. and D. Noble (1969). "A transition state theory approach to the kinetics of conductance changes in excitable membranes." J Membr Biol **1**(1): 248-273.

Ueda, K., Y. Hirano, Y. Higashiuesato, Y. Aizawa, T. Hayashi, N. Inagaki, T. Tana, Y. Ohya, S. Takishita, H. Muratani, M. Hiraoka and A. Kimura (2009). "Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia." J Hum Genet **54**(2): 115-121.

Ueda, K., K. Nakamura, T. Hayashi, N. Inagaki, M. Takahashi, T. Arimura, H. Morita, Y. Higashiuesato, Y. Hirano, M. Yasunami, S. Takishita, A. Yamashina, T. Ohe, M. Sunamori, M. Hiraoka and A. Kimura (2004). "Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia." J Biol Chem **279**(26): 27194-27198.

Valenzuela, D., X. Han, U. Mende, C. Fankhauser, H. Mashimo, P. Huang, J. Pfeiffer, E. J. Neer and M. C. Fishman (1997). "G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca2+ channels in mouse heart." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1727-1732.

Verheijck, E. E., M. J. van Kempen, M. Veereschild, J. Lurvink, H. J. Jongsma and L. N. Bouman (2001). "Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution." Cardiovasc Res **52**(1): 40-50.

Verheijck, E. E., A. Wessels, A. C. van Ginneken, J. Bourier, M. W. Markman, J. L. Vermeulen, J. M. de Bakker, W. H. Lamers, T. Opthof and L. N. Bouman (1998). "Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition." Circulation **97**(16): 1623-1631.

Vinogradova, T. M., K. Y. Bogdanov and E. G. Lakatta (2002). "beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells." Circ Res **90**(1): 73-79.

Vinogradova, T. M., Y. Y. Zhou, V. Maltsev, A. Lyashkov, M. Stern and E. G. Lakatta (2004). "Rhythmic ryanodine receptor Ca2+ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization." Circ Res **94**(6): 802-809.

Viscomi, C., C. Altomare, A. Bucchi, E. Camatini, M. Baruscotti, A. Moroni and D. DiFrancesco (2001). "C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J Biol Chem **276**(32): 29930-29934.

Wiese, C., T. Grieskamp, R. Airik, M. T. Mommersteeg, A. Gardiwal, C. de Gier-de Vries, K. Schuster-Gossler, A. F. Moorman, A. Kispert and V. M. Christoffels (2009). "Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3." Circ Res **104**(3): 388-397.

Xiao, G. Q., K. Hu and M. Boutjdir (2001). "Direct inhibition of expressed cardiac I- and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block." Circulation **103**(11): 1599-1604.

- Xue, T., E. Marban and R. A. Li (2002). "Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization." Circ Res **90**(12): 1267-1273.
- Yu, H., J. Wu, I. Potapova, R. T. Wymore, B. Holmes, J. Zuckerman, Z. Pan, H. Wang, W. Shi, R. B. Robinson, M. R. El-Maghrabi, W. Benjamin, J. Dixon, D. McKinnon, I. S. Cohen and R. Wymore (2001). "MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation." Circ Res **88**(12): E84-87.
- Zhang, H., S. Li, D. Qu, B. Li, B. He, C. Wang and Z. Xu (2013). "Autologous biological pacing function with adrenergic-responsiveness in porcine of complete heart block." Int J Cardiol **168**(4): 3747-3751.
- Zhang, Z., Y. He, D. Tuteja, D. Xu, V. Timofeyev, Q. Zhang, K. A. Glatzer, Y. Xu, H. S. Shin, R. Low and N. Chiamvimonvat (2005). "Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice." Circulation **112**(13): 1936-1944.
- Zhang, Z., Y. Xu, H. Song, J. Rodriguez, D. Tuteja, Y. Namkung, H. S. Shin and N. Chiamvimonvat (2002). "Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice." Circ Res **90**(9): 981-987.
- Zuccotti, A., S. Clementi, T. Reinbothe, A. Torrente, D. H. Vandael and A. Pirone (2011). "Structural and functional differences between L-type calcium channels: crucial issues for future selective targeting." Trends Pharmacol Sci **32**(6): 366-375.



PNAS

G protein-gated I_{KACH} channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block

Pietro Mesirca^{a,b,c,1}, Isabelle Bidaud^{a,b,c}, François Briec^d, Stéphane Evain^d, Angelo G. Torrente^{a,b,c}, Khai Le Quang^{d,e}, Anne-Laure Leoni^b, Matthias Baudot^{a,b,c}, Laurine Marger^{a,b,c}, Antony Chung You Chong^{a,b,c}, Joël Nargeot^{a,b,c}, Joerg Striessnig^f, Kevin Wickman^g, Flavien Charpentier^{d,e,h,i,2}, and Matteo E. Mangoni^{a,b,c,1,2}

^aDépartement de Physiologie, Institut de Genomique Fonctionnelle, Laboratory of Excellence in Ion Channel Science and Therapeutics, UMR-5203, CNRS, F-34094 Montpellier, France; ^bINSERM U661, F-34094 Montpellier, France; ^cUniversité de Montpellier, F-34094 Montpellier, France; ^dINSERM, UMR_S1087, l'Institut du Thorax, F-44007 Nantes, France; ^eUniversité de Nantes, F-44007 Nantes, France; ^fInstitute of Pharmacy, Pharmacology and Toxicology and Center of Molecular Biosciences Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Austria; ^gDepartment of Pharmacology, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455; ^hCNRS UMR 6291, l'Institut du Thorax, F-44007 Nantes, France; and ⁱCentre Hospitalier Universitaire Nantes, F-44007 Nantes, France

Edited by William A. Catterall, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, and approved December 29, 2015 (received for review August 31, 2015)

Dysfunction of pacemaker activity in the sinoatrial node (SAN) underlies "sick sinus" syndrome (SSS), a common clinical condition characterized by abnormally low heart rate (bradycardia). If untreated, SSS carries potentially life-threatening symptoms, such as syncope and end-stage organ hypoperfusion. The only currently available therapy for SSS consists of electronic pacemaker implantation. Mice lacking L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels ($Ca_v1.3^{-/-}$) recapitulate several symptoms of SSS in humans, including bradycardia and atrioventricular (AV) dysfunction (heart block). Here, we tested whether genetic ablation or pharmacological inhibition of the muscarinic-gated K^+ channel (I_{KACH}) could rescue SSS and heart block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. We found that genetic inactivation of I_{KACH} abolished SSS symptoms in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice without reducing the relative degree of heart rate regulation. Rescuing of SAN and AV dysfunction could be obtained also by pharmacological inhibition of I_{KACH} either in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice or following selective inhibition of $Ca_v1.3$ -mediated L-type Ca^{2+} ($I_{Ca,L}$) current in vivo. Ablation of I_{KACH} prevented dysfunction of SAN pacemaker activity by allowing net inward current to flow during the diastolic depolarization phase under cholinergic activation. Our data suggest that patients affected by SSS and heart block may benefit from I_{KACH} suppression achieved by gene therapy or selective pharmacological inhibition.

heart rate regulation | sick sinus syndrome | heart block | GIRK4 | $Ca_v1.3$

Pacemaker activity of the sinoatrial node (SAN) controls heart rate under physiological conditions. Abnormal generation of SAN automaticity underlies "sick sinus" syndrome (SSS), a pathological condition manifested when heart rate is not sufficient to meet the physiological requirements of the organism (1). Typical hallmarks of SSS include SAN bradycardia, chronotropic incompetence, SAN arrest, and/or exit block (1–3). SSS carries incapacitating symptoms, such as fatigue and syncope (1–3). A significant percentage of patients with SSS present also with tachycardia-bradycardia syndrome (3). SSS can also be associated with atrioventricular (AV) conduction block (heart block) (1–3). Although aging is a known intrinsic cause of SSS (4), this disease appears also in the absence of any associated cardiac pathology and displays a genetic legacy (1, 2). Heart disease or drug intake can induce acquired SSS (2). Symptomatic SSS requires the implantation of an electronic pacemaker. SSS accounts for about half of all pacemaker implantations in the United States (5, 6). The incidence of SSS has been forecasted to increase during the next 50 y, particularly in the elder population (7). Furthermore, it has been estimated that at least half of SSS patients will need to be electronically paced (7). Although pacemakers are continuously ameliorated, they remain costly and require lifelong follow-up. Moreover, the implantation of an electronic pacemaker remains difficult in pediatric patients (8). Development of alternative and complementary pharmacological or molecular therapies for SSS management could improve quality of life and limit the need for implantation of electronic pacemakers.

Recently, the genetic bases of some inherited forms of SSS have been elucidated (recently reviewed in 1, 9) with the discovery of mutations in genes encoding for ion channels involved in cardiac automaticity (4, 9, 10). Notably, loss of function of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels is central in some inherited forms of SSS. For instance, loss of function in $Ca_v1.3$ -mediated L-type Ca^{2+} ($I_{Ca,L}$) current causes the sinoatrial node dysfunction and deafness syndrome (SANDD) (10). Affected individuals with SANDD present with profound deafness, bradycardia, and dysfunction of AV conduction (10). Mutation in ankyrin-B causes SSS by reduced membrane targeting of $Ca_v1.3$ channels (11). The relevance of $Ca_v1.3$ channels to SSS is demonstrated also by work on the pathophysiology of congenital heart block, where down-regulation of $Ca_v1.3$ channels by maternal Abs causes heart block in infants (12). Additionally, recent data show that chronic iron overload induces acquired SSS via a reduction in $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ (13).

In mice and humans, $Ca_v1.3$ channels are expressed in the SAN, atria, and the AV node but are absent in adult ventricular tissue (14, 15). $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ plays a major role in the generation of the diastolic depolarization in SAN and AV

Significance

The "sick sinus" syndrome (SSS) is characterized by abnormal formation and/or propagation of the cardiac impulse. SSS is responsible for about half of the total implantations of electronic pacemakers, which constitute the only currently available therapy for this disorder. We show that genetic ablation or pharmacological inhibition of the muscarinic-gated K^+ channel (I_{KACH}) prevents SSS and abolishes atrioventricular block in model mice without affecting the relative degree of heart rate regulation. We propose that "compensatory" genetic or pharmacological targeting of I_{KACH} channels may constitute a new paradigm for restoring defects in the balance between inward and outward currents in pacemaker cells. Our study may thus open a new therapeutic perspective to manage dysfunction of formation and conduction of the cardiac impulse.

Author contributions: P.M., F.C., and M.E.M. designed research; P.M., I.B., F.B., S.E., A.G.T., K.L.Q., A.-L.L., M.B., L.M., and A.C.Y.C. performed research; P.M., I.B., F.B., S.E., A.G.T., K.L.Q., A.-L.L., M.B., L.M., A.C.Y.C., F.C., and M.E.M. analyzed data; and J.N., J.S., K.W., F.C., and M.E.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: pietro.mesirca@igf.cnrs.fr or matteo.mangoni@igf.cnrs.fr.

²F.C. and M.E.M. contributed equally to this work.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1517181113/-DCSupplemental.

myocytes, thereby constituting important determinants of heart rate and AV conduction velocity (14, 16). The heart rate of mice lacking $Ca_v1.3$ channels ($Ca_v1.3^{-/-}$ mice) fairly recapitulates the hallmarks of SSS and associated symptoms, including bradycardia and tachycardia-bradycardia syndrome (17, 18). In addition, severe AV dysfunction is recorded in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice to variable degrees. Typically, these mice show first- and second-degree AV block (16, 17, 19). Complete AV block with dissociated atrial and ventricular rhythms can also be observed in these animals. The phenotype of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice thus constitutes a unique model for developing new therapeutic strategies against SSS (10).

The muscarinic-gated K^+ channel (I_{KACH}) is involved in the negative chronotropic effect of the parasympathetic nervous system on heart rate (20, 21). Two subunits of the G-protein activated inwardly rectifying K^+ channels (GIRK1 and GIRK4) of the GIRK/Kir3 subfamily assemble as heterotetramers to form cardiac I_{KACH} channels (22). Indeed, both $Girk1^{-/-}$ and $Girk4^{-/-}$ mice lack cardiac I_{KACH} (20, 21, 23). We recently showed that silencing of the hyperpolarization-activated current “funny” (I_f) channel in mice induces a complex arrhythmic profile that can be rescued by concurrent genetic ablation of $Girk4$ (24). In this study, we tested the effects of genetic ablation and pharmacological inhibition of I_{KACH} on the $Ca_v1.3^{-/-}$ mouse model of SSS. We found that $Girk4$ ablation or pharmacological inhibition of I_{KACH} rescues SSS and AV dysfunction in $Ca_v1.3^{-/-}$. Thus, our study shows that I_{KACH} targeting may be pursued as a therapeutic strategy for treatment of SSS and heart block.

Results

Pharmacological Inhibition of the Autonomic Nervous System Improved Heart Rate of $Ca_v1.3^{-/-}$ Mice. We first studied heart rate and rhythm by telemetric recording of ECGs in freely moving WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (Fig. 1A and B). WT animals displayed a normal heart rate with no signs of SAN dysfunction or AV block (Fig. 1A). In contrast, $Ca_v1.3^{-/-}$ mice showed typical hallmarks of SSS, including SAN bradycardia, SAN pauses, prolonged AV conduction time (PR interval), and frequent episodes of AV block (Fig. 1B and *SI Appendix*, Table S1). Pharmacological inhibition of autonomic nervous system input by combined systemic administration of atropine and propranolol significantly reduced heart rate in WT, but not $Ca_v1.3^{-/-}$, mice. Instead, injection of atropine and propranolol abolished SAN pauses and AV blocks in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, suggesting that the activity of the autonomic nervous system induced symptoms of SAN failure and AV dysfunction in these mice (Fig. 1B and *SI Appendix*, Table S1).

Genetic or Pharmacological Ablation of I_{KACH} Improved SAN Function and AV Conduction in $Ca_v1.3^{-/-}$ Mice. Because inhibition of autonomic input improved SAN and AV conduction of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, we investigated the functional bases of this SSS-rescuing effect. I_{KACH} is a major cardiac effector of the parasympathetic nervous system (20, 21). We thus hypothesized that genetic inactivation of $Girk4$, which leads to a complete loss of cardiac I_{KACH} (20), might reduce the influence of the parasympathetic nervous system on rhythmogenic centers of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, thereby ameliorating the cardiac phenotypes in this mutant mouse strain. Accordingly, we crossed $Ca_v1.3^{-/-}$ mice with $Girk4^{-/-}$ mice and studied heart rate and rhythm in $Girk4^{-/-}$ mice and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ double-mutant mice.

As was shown previously (21, 23), the heart rate of $Girk4^{-/-}$ mice was significantly higher than the heart rate of WT controls, and these mice presented normal AV conduction and response to injection of atropine and propranolol (Fig. 1D). The ratio between maximal and minimal heart rates was similar in WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$, and $Girk4^{-/-}$ mice, indicating that combined deletion of $Ca_v1.3$ and I_{KACH} did not diminish the relative degree of heart rate regulation (*SI Appendix*, Fig. S1). Remarkably, both the ventricular rate (RR interval) and SAN rate (PP interval) of $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice were higher than

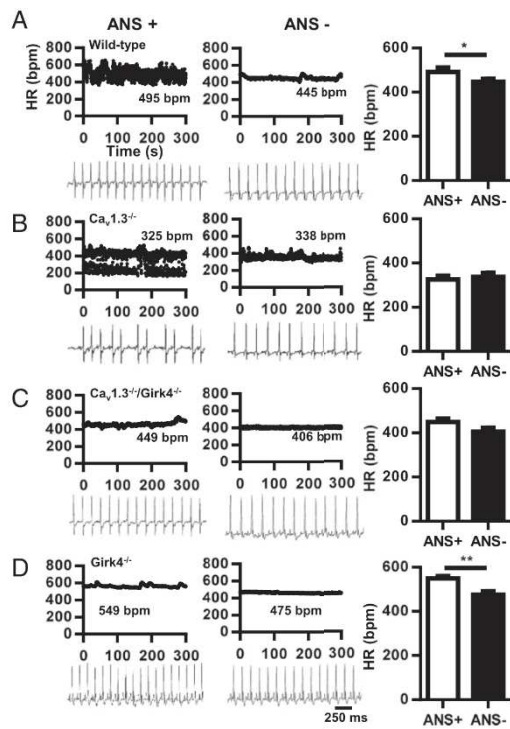


Fig. 1. Dependence of heart block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice on autonomic nervous system (ANS) activity. (A) Dot plot of beat-to-beat variability [heart rate (HR) in bpm] of heart rate (Top) and representative samples of telemetric ECG recordings (Bottom) from WT mice before (Left, ANS+) and after (Right, ANS-) combined injection of atropine (A, 0.5 mg/kg) and propranolol (P, 5 mg/kg). (Right) Histogram shows averaged heart rate before (open bar) and after (filled bar) injection of A + P ($n = 13$). (B) Same as in A, but for $Ca_v1.3^{-/-}$ mice ($n = 8$). (C) Same as in A, but for $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice ($n = 15$). (D) Same as in A, but for $Girk4^{-/-}$ mice ($n = 9$). Statistics: paired Student's *t* test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

the ventricular rate and SAN rate of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice and did not differ from the ventricular rate and SAN rate of WT controls (Fig. 1C and *SI Appendix*, Table S1). $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice also had shorter AV (PR) intervals than their $Ca_v1.3^{-/-}$ counterparts (*SI Appendix*, Table S1), suggesting that I_{KACH} also exerted a tonic inhibition on impulse conduction of $Ca_v1.3^{-/-}$ animals. Furthermore, the frequency of SAN pauses and AV blocks was reduced by about 10-fold in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice in comparison to $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, showing that $Girk4$ inactivation strongly improved SAN function and AV conduction. Blocking of muscarinic receptors by injection of atropine mimicked the effects of genetic deletion of I_{KACH} in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. Indeed, atropine abolished AV block and drastically reduced the frequency of SAN pauses in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice but not in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice (*SI Appendix*, Table S2), indicating that the effects of autonomic inhibition of the muscarinic pathway on impulse generation and conduction were entirely dependent on I_{KACH} function. Analysis of heart rate variability (HRV) spectra of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice showed high variability in comparison to WT mice, a characteristic attributable to the lower and variable SAN rate and to the presence of intermittent SAN pauses and AV blocks (*SI Appendix*, Fig. S2). Indeed, concurrent genetic ablation

of I_{KACH} by *Girk4* inactivation significantly reduced the HRV of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (SI Appendix, Fig. S2). The HRV of WT and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice did not significantly differ (SI Appendix, Fig. S2 B and C and Inset). These observations indicated that genetic ablation of I_{KACH} rescued SSS and heart block of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice without reducing heart rate regulation.

The I_{KACH} peptide blocker tertiapin-Q (25) was also effective in rescuing SAN dysfunction and AV block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (Fig. 2). Tertiapin-Q did not affect the heart rate of WT, *Girk4*^{-/-}, and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice (Fig. 2 A–C). In contrast, injection of tertiapin-Q (5 mg/kg) improved the heart rate of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice by increasing SAN rate and abolishing SAN pauses and AV blocks (Fig. 2D and SI Appendix, Table S3). The AV interval was also shortened by tertiapin-Q.

Injection of tertiapin-Q reduced the HRV of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice but did not significantly affect HRV in their $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ counterparts, indicating that the rescuing effect of this GIRK channel blocker was attributable to I_{KACH} inhibition (SI Appendix, Fig. S3). We also tested whether I_{KACH} inhibition could antagonize heart rate slowing and AV block induced by selective pharmacological inhibition of $Ca_v1.3$ -mediated I_{CaL} (SI Appendix,

Fig. S4). To this end, we used mice in which $Ca_v1.2$ channels have been rendered insensitive to dihydropyridines (DHPs) via point mutation, eliminating channel sensitivity to these drugs ($Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$ mice) (26). Indeed, because the mouse heart expresses both $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels, $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$ mice permit isolation of the effects of selective inhibition of $Ca_v1.3$ -mediated I_{CaL} (26, 27). In vivo telemetric recordings of $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$ mice injected with the DHP blocker amlodipine showed heart rate slowing that was quantitatively similar to the heart rate slowing observed in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (SI Appendix, Fig. S4A). In addition, amlodipine induced slowing of AV conduction and blocks in $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$ mice (SI Appendix, Fig. S4B). In contrast, concurrent injection of tertiapin-Q and amlodipine prevented heart rate slowing and AV blocks, demonstrating that pharmacological inhibition of I_{KACH} was effective in antagonizing drug-induced bradycardia (SI Appendix, Fig. S4 B and C). Taken together, these observations demonstrated that I_{KACH} activity underlies the phenotypic manifestations of SSS and AV block in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$ mice, and that genetic ablation or pharmacological inhibition of this current can rescue heart rhythm.

I_{KACH} Ablation Reduced A₁ Adenosine Receptor-Mediated Bradycardia in $Ca_v1.3^{-/-}$ Mice. Adenosine slows SAN rate via activation of A₁ adenosine receptors (A₁R) and opening of I_{KACH} channels (20, 28, 29). Release of adenosine can worsen SSS by leading to excessive bradycardia (30). We thus assessed the capability of I_{KACH} ablation to moderate bradycardia induced by A₁R activation in SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. We used i.p. injection of the A₁R-selective agonist 2-chloro, N₆-cyclopentyl adenosine (CCPA) in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice to study SAN dysfunction and AV conduction during A₁R-induced bradycardia (SI Appendix, Fig. S5). CCPA (0.1 mg/kg) strongly slowed heart rate in WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ mice to a similar degree (55–60%). In addition, CCPA induced deep SAN bradycardia and very low heart rate in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice [≈170 beats per minute (bpm)]. However, CCPA was less effective in slowing heart rate in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice (≈30%), and no deep bradycardia was recorded in these mice. This observation demonstrated the effectiveness of I_{KACH} ablation for preventing excessive A₁R-induced bradycardia in SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ mice.

I_{KACH} Ablation Precluded Inducibility of Atrial Tachyarrhythmias in $Ca_v1.3^{-/-}$ Mice. SSS is often associated with tachycardia-bradycardia syndrome (1, 2). Consistent with previous work on a different strain of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (18), we could induce atrial fibrillation and tachycardia without previous addition of carbachol (31, 32), underscoring the strong susceptibility of SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts to atrial tachyarrhythmias (Fig. 3). We thus tested whether *Girk4* inactivation could rescue tachycardia-bradycardia syndrome by improving SAN function and reducing the inducibility of atrial tachyarrhythmias in sedated SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. We performed intracardiac ECG recordings in sedated $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice and characterized the properties of atrial rhythm in these strains (Fig. 3 A–C and SI Appendix, Table S4). Consistent with the improvement in AV conduction observed in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice in comparison to $Ca_v1.3^{-/-}$ counterparts (Figs. 1 and 2), genetic ablation of I_{KACH} shortened the AV refractory period and the Wenckebach cycle length of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (SI Appendix, Table S4). Concurrent inactivation of I_{KACH} also shortened the SAN conduction and recovery time and the SAN-atrium conduction time in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, which indicated improvement of the SAN function (SI Appendix, Table S5). Intracardiac atrial stimulation induced atrial fibrillation (Fig. 3A, Top) or atrial tachycardia (Fig. 3A, Bottom) in eight of 12 $Ca_v1.3^{-/-}$ mice tested (Fig. 3D and SI Appendix, Table S6). All arrhythmias in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice terminated spontaneously. In contrast, atrial arrhythmia could be elicited in only two of 10 $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice (Fig. 3D and SI Appendix, Table S6). Taken together, these observations indicated that I_{KACH} deletion could rescue tachycardia-bradycardia syndrome and AV block in the $Ca_v1.3^{-/-}$ mouse model of SSS.

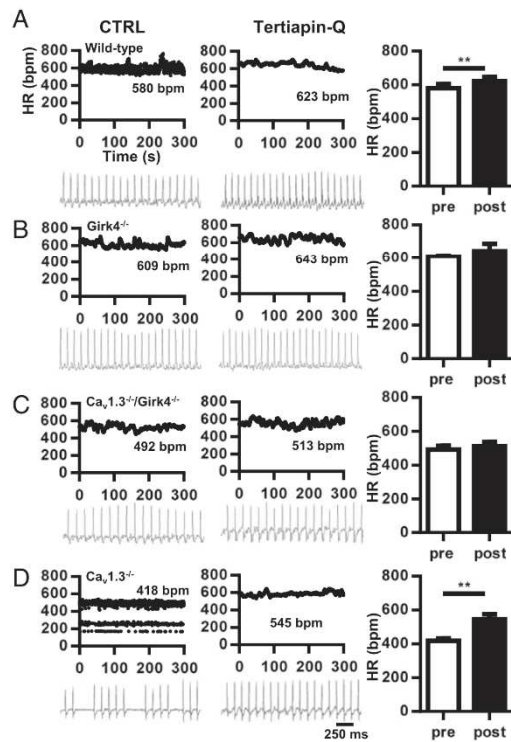


Fig. 2. Effect of the I_{KACH} blocker tertiapin-Q on bradycardia and heart block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. (A) Dot plot of beat-to-beat variability (HR in bpm) of heart rate (Top) and representative samples of telemetric ECG recordings (Bottom) from WT mice before (Left) and after (Center) i.p. injection of tertiapin-Q (5 mg/kg) in WT mice. (Right) Histogram shows averaged heart rates before (open bar) and after (filled bar) injection of tertiapin-Q ($n = 4$). (B) Same as in A, but for *Girk4*^{-/-} mice ($n = 4$). (C) Same as in A, but for $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice ($n = 4$). (D) Same as in A, but for $Ca_v1.3^{-/-}$ mice ($n = 5$). Statistics: paired Student's *t* test. ***P* < 0.01.

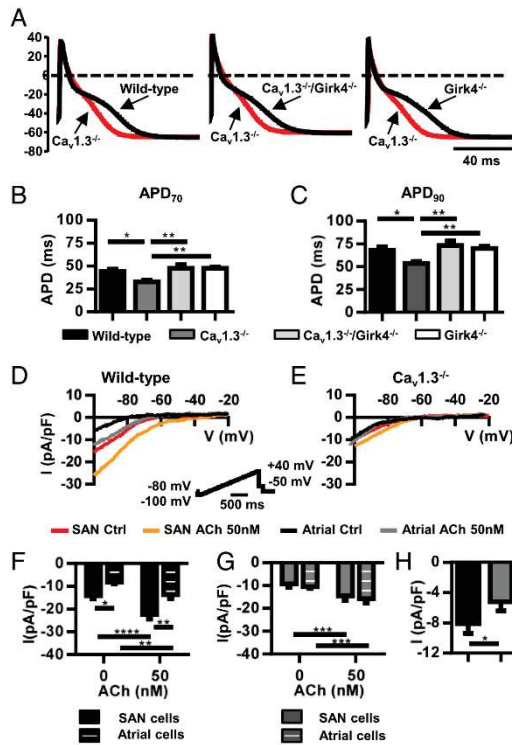


Fig. 4. Normalization of action potential duration of $Ca_v1.3^{-/-}$ atrial myocytes after $I_{K_{ACh}}$ ablation. (A) Action potential sample traces of $Ca_v1.3^{-/-}$ atrial myocytes (red trace) overlapped with action potentials from WT (Left), $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (Middle), or $Girk4^{-/-}$ myocytes (Right). Action potential durations at 70% (B, APD_{70}) and 90% (C, APD_{90}) of repolarization in $n = 14$ WT, $n = 13$ $Ca_v1.3^{-/-}$, $n = 19$ $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$, and $n = 17$ $Girk4^{-/-}$ myocytes are shown. Statistics: one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test. Sample traces of $I_{K_{ACh}}$ before and after ACh perfusion (0.05 μ M) in SAN and atrial myocytes of WT mice (D) and $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (E) are shown. (D, Inset) Voltage clamp protocol. Averaged $I_{K_{ACh}}$ densities before and after ACh are shown in the bar plots for SAN ($n = 14$) and atrial WT myocytes ($n = 11$) (F) and SAN ($n = 18$) and atrial $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes ($n = 15$) (G). (H) $I_{K_{ACh}}$ induced by ACh perfusion measured by subtracting the basal current from the basal current in ACh. Statistics: two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

myocytes in comparison to the basal spontaneous pacing rate of their $Ca_v1.3^{-/-}$ counterparts (SI Appendix, Table S7), suggesting that some $I_{K_{ACh}}$ channels are open in the SAN in the absence of exogenous ACh.

ACh decreased the pacemaker activity of WT SAN myocytes by reducing the slope of the diastolic depolarization and by increasing the frequency of delayed after-depolarizations (DADs; Fig. 6A and SI Appendix, Fig. S7), low-amplitude depolarizations of the membrane potential (≥ 10 mV) that failed to reach the action potential threshold. In contrast, ACh decreased pacemaker activity of $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes by increasing the incidence of DADs, leaving unaffected the slope of the diastolic depolarization (Fig. 6B and SI Appendix, Table S7), suggesting that formation of DADs, rather than normal action potentials, constituted the mechanism underlying ACh-induced SAN dysfunc-

tion in SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts. In agreement with this hypothesis, an increase in the frequency of DADs could be observed in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ myocytes at high concentrations of ACh (0.05 μ M; SI Appendix, Fig. S7), accounting for the rescuing of the ACh-induced negative chronotropic effect recorded in $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes. Taken together, these data demonstrated that the rescuing of SSS observed in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice was due to a strong reduction in the sensitivity of SAN pacemaker activity to ACh-mediated negative chronotropy and that $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ contributed to the cholinergic regulation of pacemaker activity in WT and $Girk4^{-/-}$ SAN.

Genetic or Pharmacological Ablation of $I_{K_{ACh}}$ Prevented the Formation of $[Ca^{2+}]_i$ Waves in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN Myocytes. The high incidence of DADs recorded during pacemaker activity under perfusion of ACh suggested altered intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) dynamics and the frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves in $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes. We thus used confocal line scan imaging of Fluo-4-loaded cells to test whether ablation of $I_{K_{ACh}}$ could rescue $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in SAN myocytes from $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (Fig. 7). Consistent with the slow pacemaker activity observed under current-clamp conditions (Fig. 6), we recorded slower frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes in comparison to the spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients of WT, $Girk4^{-/-}$, and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ myocytes (Fig. 7A–D, Left and Middle).

In WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, and $Girk4^{-/-}$ myocytes, ACh reduced the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients and induced the formation of $[Ca^{2+}]_i$ waves (Fig. 7A, B, and D). In $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ SAN myocytes, the rate of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients was similar to the rate of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients of WT and $Girk4^{-/-}$ cells, and the frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves was lower than the frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves recorded in the other genotypes (Fig. 7C). In $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ myocytes, ACh failed to decrease the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients and to increase the frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves (Fig. 7C). Consistent with this observation, ACh did not decrease the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients or increase $[Ca^{2+}]_i$ waves in $Ca_v1.3^{-/-}$ cells when tertipin-Q was added to the perfusion medium (SI Appendix, Fig. S8).

Because $I_{K_{ACh}}$ ablation in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice allowed the formation of cell-wide $[Ca^{2+}]_i$ transients instead of $[Ca^{2+}]_i$ waves, we tested whether this rescuing effect required functional ryanodine receptor (RyR)-dependent $[Ca^{2+}]_i$ release. The dose-response relationship of the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients to ryanodine showed a differential effect between WT and $Girk4^{-/-}$ SAN myocytes (SI Appendix, Fig. S9). Indeed, whereas 1 μ M ryanodine drastically reduced the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients in WT SAN myocytes, it remained higher in $Girk4^{-/-}$ myocytes (SI Appendix, Fig. S9A). A saturating concentration of ryanodine (3 μ M) that completely disabled RyR-dependent Ca^{2+} release drastically reduced spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients and action potentials in both WT and $Girk4^{-/-}$ SAN myocytes, indicating that pacemaker activity required RyR-dependent Ca^{2+} release (SI Appendix, Fig. S9B).

Concurrent perfusion of a moderate concentration of ryanodine (0.3 μ M) with ACh (0.01 μ M) did not significantly affect the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients in $Girk4^{-/-}$ myocytes. This observation suggested that ablation of $I_{K_{ACh}}$ could rescue the loss of RyR-dependent Ca^{2+} release in WT SAN myocytes at moderate concentrations of ryanodine (SI Appendix, Figs. S10 and S11). Moreover, the relative insensitivity to 0.01 μ M ACh of ryanodine-treated $Girk4^{-/-}$ SAN myocytes suggested that regulation of RyR-dependent Ca^{2+} release contributes to cholinergic regulation of pacemaking. In contrast, the frequencies of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients of WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ SAN myocytes were strongly reduced by ryanodine and ACh, and to comparable levels (SI Appendix, Figs. S10 and S11). These observations showed that although $I_{K_{ACh}}$

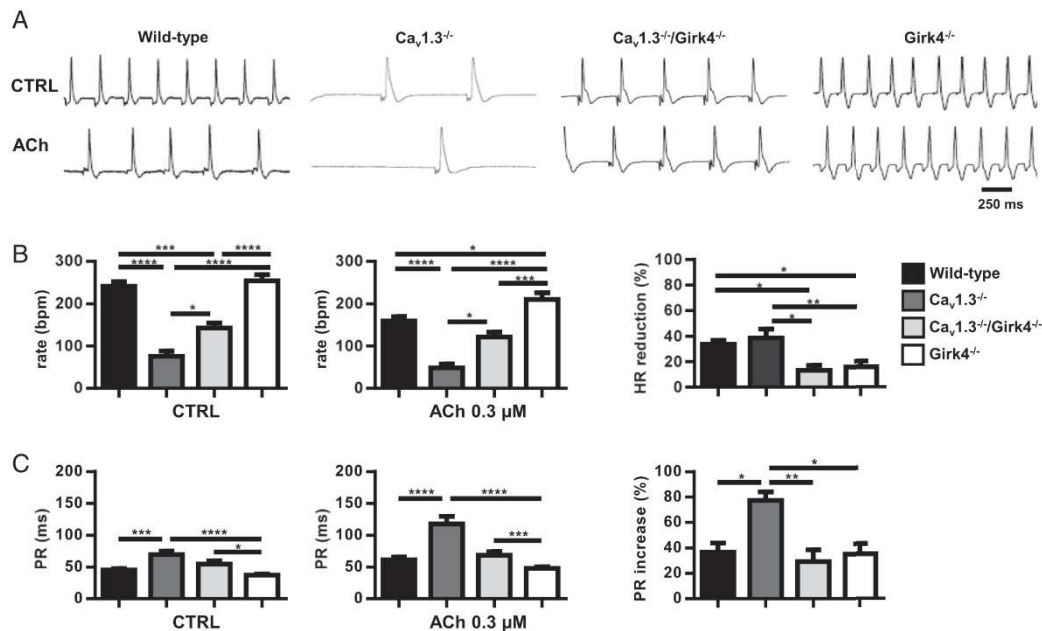


Fig. 5. ACh (0.3 μM) effect on heart rate and AV conduction in isolated Langendorff-perfused hearts. (A) Representative traces in CTRL conditions (Top) and ACh-perfused (Bottom) hearts from WT, Ca_v1.3^{-/-}, Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}, and Girk4^{-/-} mice. (B) Mean value of heart rate in control (Left; n = 13 WT, n = 8 Ca_v1.3^{-/-}, n = 7 Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}, and n = 16 Girk4^{-/-} hearts) and ACh-perfused (Middle; n = 12 WT, n = 9 Ca_v1.3^{-/-}, n = 7 Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}, and n = 16 Girk4^{-/-} hearts) hearts. (Right) ACh-dependent heart rate reduction expressed as percentage measured in the different mouse strains studied. (C) Mean value of PR interval in Tyrode's solution (n = 9 WT, n = 9 Ca_v1.3^{-/-}, n = 8 Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}, and n = 10 Girk4^{-/-} hearts; Left) and ACh (n = 9 WT, n = 9 Ca_v1.3^{-/-}, n = 8 Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}, and n = 8 Girk4^{-/-} hearts; Middle) perfused hearts. (Right) ACh-dependent PR interval reduction expressed as percentage. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

ablation could antagonize the negative chronotropic effect induced by ryanodine and ACh in WT cells containing functional Ca_v1.3-mediated I_{Ca,L}, rescuing of automaticity in Ca_v1.3^{-/-} SAN myocytes under ACh required fully functional RyR-dependent Ca²⁺ release.

I_{KACH} Ablation Maintained the Diastolic Current in the Inward Direction During Muscarinic Activation. Pacemaker activity requires the presence of a net inward current to sustain the diastolic depolarization. Because cholinergic activation of I_{KACH} generates an outward current, we hypothesized that upon parasympathetic activation, the lack of Ca_v1.3-mediated I_{Ca,L} shifts the net membrane current of SAN and AV node myocytes in the outward direction, thereby inducing SAN failure and AV block. We thus tested the effects of I_{KACH} ablation on the total diastolic current by using a train of spontaneous action potentials recorded in WT SAN cells as voltage-clamp commands (Fig. 8). Ca_v1.3^{-/-} SAN myocytes showed reduced total inward diastolic current in comparison to their WT counterparts under basal conditions (Fig. 8A and B). Perfusion with ACh (0.05 μM) shifted the direction of the diastolic current from inward to outward in WT and Ca_v1.3^{-/-} myocytes (Fig. 8A and B). ACh reduced the diastolic current also in Girk4^{-/-} myocytes, but the net current direction remained inward (Fig. 8C). This evidence is in line with current-clamp experiments that showed arrest of cell pacemaker activity at this ACh concentration in WT and Ca_v1.3^{-/-} myocytes, but not in Girk4^{-/-} cells (Fig. 6). In contrast, ACh did not significantly affect the diastolic current in Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-} SAN myocytes at any concentration tested (Fig. 8D). This observation was consistent

with the strong reduction of the cholinergic regulation of cell pacemaker activity of Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-} SAN myocytes (Fig. 6) and indicates that, together with I_{KACH} and RyR-dependent [Ca²⁺]_i release, Ca_v1.3-mediated I_{Ca,L} is an effector of cholinergic regulation of pacemaker activity. These results indicate that genetic ablation or pharmacological inhibition of I_{KACH} prevented ACh-mediated slowing of pacemaker activity by maintaining the net diastolic current in the inward direction and preventing the formation of [Ca²⁺]_i waves (Fig. 7).

Discussion

In this study, we demonstrated that genetic ablation or pharmacological inhibition of I_{KACH} strongly ameliorates SAN dysfunction, prevents tachycardia-bradycardia syndrome, and normalizes AV impulse conduction in a mouse model of human SSS. I_{KACH} ablation did not reduce the relative degree of heart rate regulation, and we did not observe episodes of ventricular arrhythmia in Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-} or Ca_v1.3^{-/-} mice treated with tertiapin-Q. These observations suggest that I_{KACH} inhibition preserves the capability of the organism to regulate heart rate without being, by itself, proarrhythmic. At present, no pharmacological therapy is available to improve heart rate and AV conduction in the context of SSS. Thus, our work suggests that genetic or pharmacological targeting of I_{KACH} channels may be efficacious in the management of SSS and heart block.

Several studies highlight the importance of Ca_v1.3-mediated I_{Ca,L} in human pathologies of heart rhythm and indicate that Ca_v1.3^{-/-} mice constitute a suitable preclinical model for testing

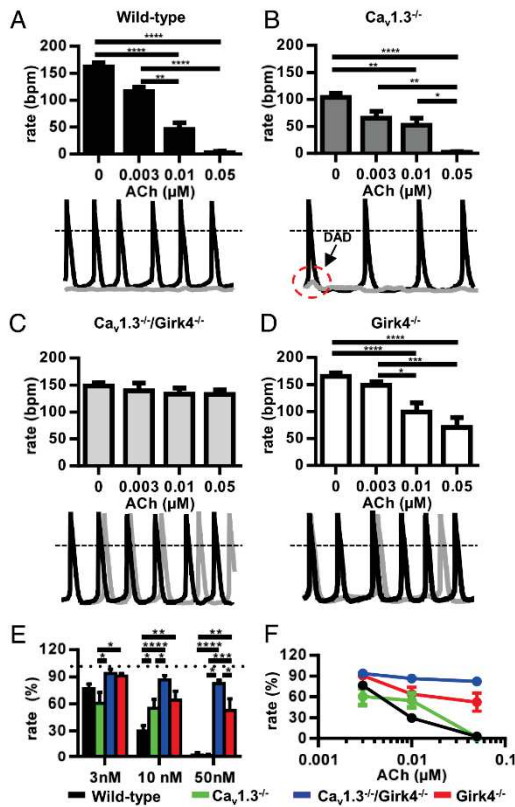


Fig. 6. Slowing of pacemaker activity of $Ca_v1.3^{+/+}$ SAN myocytes after ACh inhibition. Histograms of spontaneous action potential rate recorded in control conditions and after perfusion of ACh at the indicated doses in SAN myocytes from WT (A, Top), $Ca_v1.3^{-/-}$ (B, Top), $Ca_v1.3^{+/Girk4^{+/-}}$ (C, Top), and $n = 9$ $Girk4^{-/-}$ (D, Top) mice. Examples of spontaneous SAN cells action potentials recorded from WT (A, Bottom), $Ca_v1.3^{-/-}$ (B, Bottom), $Ca_v1.3^{+/Girk4^{+/-}}$ (C, Bottom), and $Girk4^{-/-}$ (D, Bottom) mice in control conditions (black traces) and after perfusion of ACh (0.05 μ M, gray traces). (A–D) Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparisons test. (E and F) Dose–response relation of the percentages of rate reduction at different doses ACh in SAN cells isolated from WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{+/Girk4^{+/-}}$, and $Girk4^{-/-}$ mice. (E) Statistics: two-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparisons test. The number of SAN cells measured is reported in *SI Appendix, Table S7* for each genotype and ACh concentration. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

new therapeutic strategies for SSS and heart block. Indeed, $Ca_v1.3^{-/-}$ mice present several aspects of human SSS (10, 18), including SAN dysfunction (1, 2) and tachycardia-bradycardia syndrome (33, 34). In addition, $Ca_v1.3^{-/-}$ mice reproduce severe AV dysfunction typical of human congenital heart block (16).

Previous studies demonstrated that $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ plays a major role in the determination of heart rate and impulse conduction in mice and humans (10, 11, 14, 16, 17, 19). However, despite the importance of $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ in determining the rate of the diastolic depolarization in isolated SAN and AV node myocytes (14, 16), it was unclear how $Ca_v1.3$ loss of function translates into SSS in vivo. In this respect, we show, for the first time to our knowledge, that SSS symptoms and AV block in vivo

in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice depend upon I_{KACH} and that targeted inhibition of these channels can rescue SSS. Indeed, we did not record SAN failure or AV block in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice, and we did not detect SAN failure or AV block following injection of tertiapin-Q in $Ca_v1.3^{-/-}$ or $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice treated with amlodipine. In this respect, the rescue of bradycardia was particularly striking, because the heart rate of all these “rescued” mice was normalized, reaching values that were close to the values recorded in WT or control uninjected $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice (*SI Appendix, Fig. S4*). This result indicates that structural or functional remodeling of rhythmogenic centers of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice is not the primary mechanism mediating the rescuing effect on heart rate by I_{KACH} targeting.

Normal SAN pacemaker activity is generated by a complex interplay between inward ionic currents of the plasma membrane, such as $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$, $Ca_v3.1$ -mediated T-type Ca^{2+} current ($I_{Ca,T}$), hyperpolarization-activated current “funny” (I_f), and Na^+/Ca^{2+} exchanger current (I_{NCX}) activated by RyR-dependent $[Ca^{2+}]_i$ release (35–37). With regard to the SAN pacemaker mechanism, two mutually connected concepts emerge from our findings. First, although I_{KACH} constitutes an important mechanism in heart rate control (20, 21), its activity becomes detrimental for cardiac automaticity and rhythm following loss of function of ion channels, contributing to the generation of the diastolic depolarization (24) (Figs. 1 and 2). Second, our study indicates that an intrinsic functional redundancy among ion channels involved in the SAN pacemaker mechanism allows viable heart rate and heart rate regulation without SSS symptoms, provided that I_{KACH} activity is abolished or suppressed (Figs. 1–3 and 8).

Rescuing of tachycardia-bradycardia syndrome in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ demonstrates that I_{KACH} activity constitutes a major mechanism underlying SSS symptoms and associated arrhythmias. In this respect, atrial action potential shortening and reduced $I_{Ca,L}$ are important cellular mechanisms underlying atrial fibrillation (38–40). Similar to what is observed in experimental animal models of paroxysmal atrial fibrillation lacking SSS and heart block (41–44), normalization of the atrial action potential duration of $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes can account for prevention of atrial tachyarrhythmia in this model of SSS. However, because $Ca_v1.3^{-/-}$ mice have an intrinsically low SAN rate, we cannot exclude the possibility that SAN dysfunction in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice also contributes to the susceptibility to atrial arrhythmias. This mechanism would still be consistent with the observed rescuing of tachycardia-bradycardia syndrome in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice, because I_{KACH} ablation also prevented SAN dysfunction (*SI Appendix, Table S4*).

In comparison to individuals with sinus rhythm, agonist-independent constitutive I_{KACH} activity (45) and reduced expression of I_{KACH} (46) in atrial myocytes are typical of patients with chronic atrial fibrillation. $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes showed reduced basal I_{KACH} and diminished density of agonist-induced current in comparison to WT myocytes (Fig. 4). I_{KACH} downregulation in pacemaker tissue and/or atria can thus constitute a common compensatory mechanism between mice and humans to counteract I_{KACH} -induced SSS symptoms or atrial arrhythmias.

We attribute the rescue of SAN function in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice to the ability of I_{KACH} ablation or inhibition to prevent ACh-induced formation of $[Ca^{2+}]_i$ waves (Fig. 7) and DADs (Fig. 6), as well as to the shift of the total diastolic membrane current to the inward direction under ACh in $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ in comparison to $Ca_v1.3^{-/-}$ pacemaker myocytes (Fig. 8A–D). This view can be summarized by a general model in which pacemaker activity is determined by the balance between inward currents contributing to the diastolic depolarization and I_{KACH} , which brakes automaticity by supplying outward current (Fig. 8E). Loss of $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ generates an imbalance between inward and outward currents that induces dysfunction of pacemaker activity. Normal pacemaking can thus be restored by genetic or pharmacological inhibition of I_{KACH} . Under these conditions, the

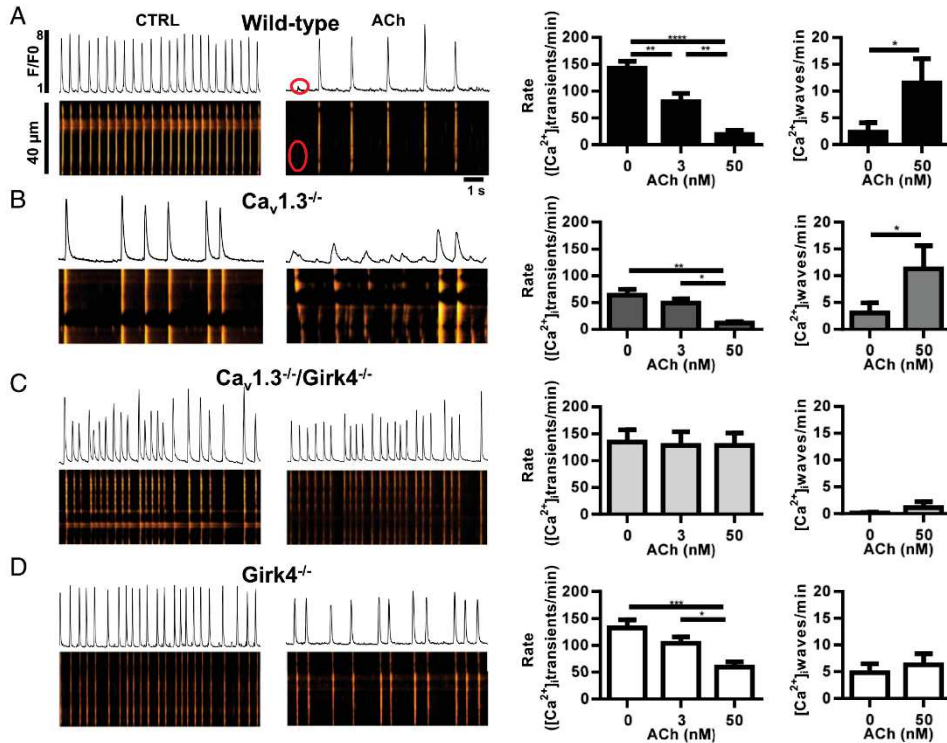


Fig. 7. Suppression of $[Ca^{2+}]_i$ waves in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes after ablation of I_{KACH} . Sample line scan images (Left), averaged frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients (Middle), and averaged frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves (Right) of $n = 11$ WT (A), $n = 9$ $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), $n = 6$ $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (C), and $n = 12$ $Girk4^{-/-}$ (D) SAN myocytes. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. $*P < 0.05$; $***P < 0.01$; $****P < 0.001$; $*****P < 0.0001$.

other currents contributing to the diastolic depolarization, such as I_{NCX} (37), $I_{Ca,T}$ (47), and I_f (36), are sufficient to drive normal pacemaker activity (Fig. 8E). This model is consistent also with our evidence showing that I_{KACH} ablation can rescue the slowing of pacemaker activity induced by moderate inhibition of RyR-dependent $[Ca^{2+}]_i$ release of WT, but not $Ca_v1.3^{-/-}$, SAN myocytes (SI Appendix, Figs. S9–S11). Indeed, although $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ could maintain the balance following concurrent loss of inward I_{NCX} and outward I_{KACH} , additional loss of $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ would induce imbalance, and consequently dysfunction of pacemaker activity.

Our evidence indicates that the maintenance of a net inward current in the diastolic phase by I_{KACH} ablation could allow DADs to trigger a full SAN impulse or promote successful AV conduction, thereby preventing SAN pauses and AV block in vivo. $[Ca^{2+}]_i$ waves and DADs thus appear to be a major common arrhythmogenic mechanism in the SAN and cardiac conduction system in both $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (this study) and mice carrying silenced cardiac I_f channels (24). This observation is important, because although these two mouse strains both constitute models of bradycardia, their phenotypes are effectively rescued by I_{KACH} ablation, despite presenting different associations with tachycardia-bradycardia syndrome ($Ca_v1.3^{-/-}$) or ventricular arrhythmia (24).

In conclusion, the ability of I_{KACH} ablation to rescue SAN dysfunction and AV block, as well as tachycardia-bradycardia

syndrome and ventricular tachycardia, highlights the clinical potential of I_{KACH} targeting for management of SSS and associated arrhythmias in humans. This study may thus foster preclinical research to test I_{KACH} inhibitors in various models of bradycardia and heart block. Importantly, pharmacological inhibitors of I_{KACH} already exist (41, 43). Although these inhibitors have been developed to prevent paroxysmic atrial fibrillation, our study suggests that the therapeutic indication of these molecules could be extended to SSS and heart block. Among those compounds, recently described I_{KACH} inhibitors related to the ML297 activator (48) may constitute a potential future pharmacotherapeutic approach for the treatment of SSS.

Materials and Methods

The study conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (49) and to European directives (2010/63/EU), and it was approved by the French Ministry of Agriculture (D34-172-13). An expanded version of the methods is provided in SI Appendix, Expanded Methods.

ECG Recording in Conscious Mice. Telemetric recordings of ECGs were performed utilizing a Dataquest A.R.T. recording platform (TA10EA-F20; Data Sciences International) using implantable transmitters as described previously (16). Recordings on sedated mice were performed using a six-lead surface ECG recording device with 25-gauge s.c. electrodes (IOX; EMKA Technologies). Mean heart rate values were obtained in each mouse for an overall 24-h period. For evaluating drug effects, heart rate was recorded for a total period of 8 h. Heart rate before drug injection was averaged over a 2-h period following a 2-h stabilization period. Following drug injection, mean heart

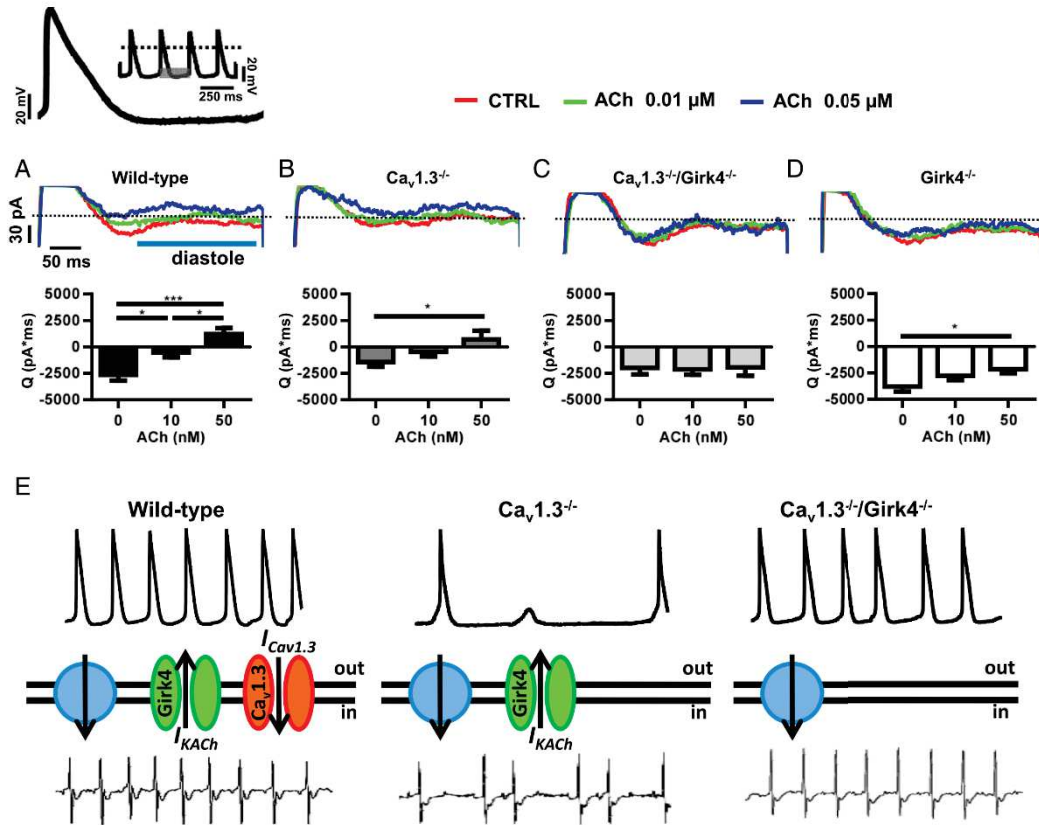


Fig. 8. Diastolic current in isolated $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ SAN myocytes and heart rate determination. Sample traces (Upper) and averaged current time integrals (Bottom) measured between the voltage corresponding to the maximum diastolic potential (-42 mV) and the following action potential threshold (-42 mV) of a sample mouse SAN action potential used as voltage-clamp command. Slopes of the linear and exponential parts of the diastolic depolarization were 0.03 and 0.98 mV \cdot ms $^{-1}$, respectively. (A, Upper) Voltage-clamp protocol is shown. Current was measured under control conditions and after perfusion of 0.01 or 0.05 μ M ACh in $n = 9$ WT (A), $n = 7$ $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), $n = 16$ $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (C), and $n = 8$ $Girk4^{-/-}$ (D) SAN myocytes. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (E) Statistics: one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test. The model of the mechanism of rescue is based on the relationship between the inward-outward current balance that determines the diastolic depolarization and the rate and stability of heart beat. In each panel, sample SAN act on potentials (Top), functional ionic currents contributing to the diastolic depolarization (Middle), and sample ECG recordings (Bottom) are shown. The green channel represents I_{KACH} , the red channel represents $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ (I_{CaT}), and the blue circle shows the idealized sum of other inward currents involved in the pacemaker mechanism (I_{NCX} , I_h , $I_{Ca,T}$). (Left to Right) Samples of ECG recordings and of pacemaker activity in WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ mice are shown.

rate values were calculated in each mouse by analyzing periods of 5 min at different time points corresponding to the peak effect of the drug. Heart rates lower than 400 bpm (20% lower than the mean heart rate recorded in WT mice) were defined as "bradycardia." Heart rates lower than 300 bpm (40% lower than the mean heart rate recorded in WT mice) were defined as "deep bradycardia."

Intracardiac Recordings and Pacing in Sedated Mice. For intracardiac explorations, we used a mouse electrophysiology octapolar catheter positioned in the right atrium and ventricle via the right internal jugular vein (Biosense Webster). Surface ECGs were used as a guide for catheter positioning. Pacing was performed with a modified Biotronik UHS20 stimulator and a digital stimulator (DS8000; World Precision Instruments). Standard pacing protocols were used to determine atrial refractoriness and AV conduction parameters and to trigger atrial arrhythmias (SI Appendix, Expanded Methods). Atrial tachycardia was defined as a salvo of at least four atrial ectopic beats leading to P waves and atrial electrograms with a shape different from the shapes recorded under sinus rate. We considered atrial tachycardia as non-

sustained when it lasted for less than 10 complexes. We defined atrial fibrillation as an atrial tachyarrhythmia with marked disorganization both on the surface ECG (with no distinguishable P waves) and on the intracardiac recording, with random AV conduction. SAN function was evaluated by measuring the resting SAN cycle length and the SAN recovery time. Atrial pacing was applied for a period of 30 s at cycle lengths of 100 ms and 80 ms. For each pacing cycle length, SAN recovery time was determined as the longest pause from the last paced atrial depolarization to the first SAN return cycle. The SAN conduction time (SACT) was determined with the Narula method, consisting of eight-stimulus trains at a cycle length slightly shorter than the spontaneous SAN cycle length to avoid overdrive suppression. The SACT was also determined by subtracting the intrinsic SAN cycle length from the interval between the last stimulus and the first spontaneous atrial complex.

Recordings on Isolated Langendorff-Perfused Hearts and Isolated SAN Myocytes. Excised hearts were mounted on a Langendorff apparatus (EMKA Technologies). The ECG was continuously recorded by Ag-AgCl electrodes positioned on the epicardial side of the right atrium close to the SAN area and near the apex.

SAN myocytes were isolated as described previously (14). Recordings of action potentials of SAN myocytes were performed using standard patch-clamp techniques.

Imaging of $[Ca^{2+}]_i$. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients were recorded in SAN pacemaker myocytes loaded with Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific) (20 mM, 35 min) at 36 °C. Images were obtained with confocal microscopy (Zeiss LSM 780) by scanning the myocyte with an argon laser in line scan configuration (3.78-ms and/or 1.53-ms line rate); fluorescence was excited at 488 nm, and emissions were collected at >505 nm. A 63 \times oil immersion objective was used to record $[Ca^{2+}]_i$ in isolated SAN myocytes. Image analyses were performed by ImageJ software (NIH). Images were corrected for the background fluorescence; waves were defined as a $[Ca^{2+}]_i$ release larger than 4 μ m and/or with an intrinsic light intensity of >10% of the intensity measured during the following spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transient. Image acquisition and analysis were performed on workstations of the MRI (Plate-forme Régionale d'Imagerie du Languedoc-Roussillon) facility.

Statistical Methods. Results are presented throughout as mean \pm SEM. The Student's *t* test, the Fisher's exact test, two-way ANOVA tests followed by Sidak's post hoc tests, or one-way ANOVA tests followed by Tukey's (or Dunnett's) post hoc tests were used to analyze categorical variables. For

calculating the level of significance, results were considered significant if $P < 0.05$. In all figures, a single asterisk indicates $P < 0.05$, two asterisks indicate $P < 0.01$, three asterisks indicate $P < 0.001$, and four asterisks indicate $P < 0.0001$. Data were analyzed using GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank former Prof. Denis Escande (Institut du Thorax) for input and support. We also thank Prof. Philippe Chevalier (Centre Hospitalier Universitaire) for critical reading of the manuscript. We are indebted to the staff of the RAM (Réseau des Animaleries de Montpellier) animal facility of the University of Montpellier for managing mouse lines. The project was supported Agence Nationale pour la Recherche (ANR) Grants ANR-06-PHISIO-004-01, ANR-09-GENO-034, and ANR-2010-BLAN-1128-01 (to M.E.M.); by the Fondation de France, Paris (Cardiovasc 2008002730 to J.N.); by the Austrian Science Fund (FWF F44020 to J.S.); and by NIH Grants R01 HL087120-A2 (to M.E.M.) and R01 HL105550 (to K.W.). P.M. and A.G.T. were supported by the CavNet, a Research Training Network funded through the European Union Research Programme (6FP) MRTN-CT-2006-035367. L.M. received a postdoctoral fellowship from the Fondation Lefoulon-Delalande (Paris). The Institut de Génétique Fonctionnelle group is a member of the Laboratory of Excellence "Ion Channel Science and Therapeutics" supported by a grant from the ANR (ANR-11-LABX-0015).

- Sanders P, Lau DH, Kalman JK (2014) Sinus node abnormalities. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, eds Zipes DP, Jalife J (Elsevier Saunders, Philadelphia), 6th Ed, pp 691–696.
- Fish FA, Benson DW (2001) Disorders of cardiac rhythm and conduction. *Moss and Adam's Heart Disease in Infants, Children and Adolescents*, eds Allen HD, Clark HP, Gutgesell HP, Driscoll DJ (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia), pp 482–533.
- Semelka M, Gera J, Usman S (2013) Sick sinus syndrome: A review. *Am Fam Physician* 87(10):691–696.
- Monfredi O, Boyett MR (2015) Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons - A view from the sinoatrial nodal myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 83:88–100.
- Mond HG, Proclemer A (2011) The 11th world survey of cardiac pacing and implantable cardioverter-defibrillators: Calendar year 2009—a World Society of Arrhythmia's project. *Pacing Clin Electrophysiol* 34(8):1013–1027.
- Damani S (2011) When the heart forgets to beat. *Sci Transl Med* 3(76):76ec42.
- Jensen PN, et al. (2014) Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general population. *J Am Coll Cardiol* 64(6):531–538.
- Rosen MR, Robinson RB, Brink PR, Cohen IS (2011) The road to biological pacing. *Nat Rev Cardiol* 8(11):656–666.
- Dobrzynski H, Boyett MR, Anderson RH (2007) New insights into pacemaker activity: Promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* 115(14):1921–1932.
- Baig SM, et al. (2011) Loss of $Ca_v1.3$ (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14(1):77–84.
- Le Scouarnec S, et al. (2008) Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(40):15617–15622.
- Qu Y, Baroudi G, Yue Y, Boutjdir M (2005) Novel molecular mechanism involving α_1D $Ca_v1.3$ L-type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia. *Circulation* 111(23):3034–3041.
- Rose RA, et al. (2011) Iron overload decreases $Ca_v1.3$ -dependent L-type Ca^{2+} currents leading to bradycardia, altered electrical conduction, and atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4(5):733–742.
- Mangoni ME, et al. (2003) Functional role of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(9):5543–5548.
- Chandler NJ, et al. (2009) Molecular architecture of the human sinus node: Insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119(12):1562–1575.
- Marger L, et al. (2011) Functional roles of $Ca_v1.3$, $Ca_v3.1$ and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: Insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels (Austin)* 5(3):251–261.
- Platzer J, et al. (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. *Cell* 102(1):89–97.
- Zhang Z, et al. (2005) Functional roles of $Ca_v1.3$ (α_1D) calcium channels in atria: Insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation* 112(13):1936–1944.
- Zhang Z, et al. (2002) Functional Roles of $Ca_v1.3$ (α_1D) calcium channel in sinoatrial nodes: Insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 90(9):981–987.
- Wickman K, Nemeček J, Gendler SJ, Clapham DE (1998) Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 20(1):103–114.
- Mesirca P, et al. (2013) The G-protein-gated K^+ channel, I_{KACH} , is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *J Gen Physiol* 142(2):113–126.
- Krapivynski G, et al. (1995) The G-protein-gated atrial K^+ channel I_{KACH} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ -channel proteins. *Nature* 374(6518):135–141.
- Bettahli I, Marker CL, Roman MJ, Wickman K (2002) Contribution of the Kir3.1 subunit to the muscarinic-gated atrial potassium channel I_{KACH} . *J Biol Chem* 277(50):48282–48288.
- Mesirca P, et al. (2014) Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of 'funny' (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat Commun* 5:4664.
- Drici MD, Diocch S, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) The bee venom peptide mertiapin underlines the role of I_{KACH} in acetylcholine-induced atrioventricular blocks. *Br J Pharmacol* 131(3):569–577.
- Sinnesger-Brauns MJ, et al. (2004) Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca^{2+} channels. *J Clin Invest* 113(10):1430–1439.
- Christel CJ, et al. (2012) Distinct localization and modulation of $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol* 590(Pt 24):6327–6342.
- Belardinelli L, Giles WR, West A (1988) Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart. *J Physiol* 405:615–633.
- Kirchhof P, et al. (2003) Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A1 adenosine receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(1):H145–H153.
- Lou Q, et al. (2014) Upregulation of adenosine A1 receptors facilitates sinoatrial node dysfunction in chronic canine heart failure by exacerbating nodal conduction abnormalities revealed by novel dual-sided intramural optical mapping. *Circulation* 130(4):315–324.
- Wakimoto H, et al. (2001) Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res* 50(3):463–473.
- Kovoor P, et al. (2001) Evaluation of the role of I_{KACH} in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 37(8):2136–2143.
- Cunha SR, et al. (2011) Defects in ankyrin-based membrane protein targeting pathways underlie atrial fibrillation. *Circulation* 124(11):1212–1222.
- Lin RJ (2011) Ankyring the heart rhythm. *Sci Transl Med* 3(100):100ec149.
- Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88(3):919–982.
- DiFrancesco D (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 106(3):434–446.
- Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM (2010) A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res* 106(4):659–673.
- Yue L, et al. (1997) Ionic remodeling underlying act on potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 81(4):512–525.
- Qi XY, et al. (2008) Cellular signaling underlying atrial tachycardia remodeling of L-type calcium current. *Circ Res* 103(8):845–854.
- Nattel S, Burstein B, Dobrev D (2008) Atrial remodeling and atrial fibrillation: Mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1(1):62–73.
- Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N (2006) Tertiapin, a selective I_{KACH} blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol Res* 54(2):136–141.
- Wirth KJ, et al. (2007) In vitro and in vivo effects of the atrial selective antiarrhythmic compound AVE1231. *J Cardiovasc Pharmacol* 49(4):197–206.
- Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N (2008) Characterization of in vivo and in vitro electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel I_{KACH} blocker, NIP-151: A comparison with an I_{K_r} -blocker dofetilide. *J Cardiovasc Pharmacol* 51(2):162–169.
- Cho KI, et al. (2014) Attenuation of acetylcholine-activated potassium current I_{KACH} by simvastatin, not pravastatin in mouse atrial cardiomyocyte: Possible atrial fibrillation preventing effects of statin. *PLoS One* 9(10):e106570.
- Dobrev D, et al. (2005) The G protein-gated potassium current I_{KACH} is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 112(24):3697–3706.
- Voigt N, et al. (2013) Impaired Na^+ -dependent regulation of acetylcholine-activated inward-rectifier K^+ current modulates action potential rate dependence in patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 61:142–152.
- Mangoni ME, et al. (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking $Ca_v3.1/\alpha_1G$ T-type calcium channels. *Circ Res* 98(11):1422–1430.
- Wydeven N, et al. (2014) Mechanisms underlying the activation of G-protein-gated inwardly rectifying K^+ (GIRK) channels by the novel anxiolytic drug, ML297. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(29):10755–10760.
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Natl Inst Health, Bethesda), DHHS Publ No. (NIH) 85-23.

Génération de la fonction sinusale et perspectives thérapeutiques



Genesis of cardiac sinus automaticity and therapeutic perspectives

P. Mesirca
A.-G. Torrente
I. Bidaud
M. Baudot
J. Nargeot
M.-E. Mangoni

CNRS, Inserm, département de physiologie,
université de Montpellier, institut de génomique
fonctionnelle, 141, rue de la Cardonille, 34094
Montpellier, France

Disponible en ligne sur ScienceDirect le 12 mars
2018

ABRÉVIATIONS

NSA nœud sino-atrial
VCS veine cave supérieure
VCI veine cave inférieure
OD oreillette droite
CT crista terminalis
SIA septum inter-atrial
OG oreillette gauche

ORIGINES ET BASES CELLULAIRES DE L'AUTOMATISME CARDIAQUE

L'automatisme du cœur est un phénomène physiologique fascinant et constitue un défi remarquable pour les chercheurs. La rythmicité spontanée (automatisme) du cœur au stade adulte est générée dans le nœud sinusal (Fig. 1A) par une population spécialisée de myocytes connus sur le terme de « cellules pacemaker » (Fig. 1A). Les myocytes cardiaques automatiques se caractérisent par une phase de dépolarisation spontanée du potentiel de membrane connue sur le terme de « dépolarisation diastolique » car elle correspond à la phase diastolique du cycle cardiaque [1]. La dépolarisation diastolique (ou phase diastolique) est une dépolarisation lente, qui conduit le potentiel de membrane à la fin d'un potentiel d'action (PA) vers le seuil du potentiel d'action suivant (Fig. 1B). La dépolarisation diastolique nécessite à chaque instant un courant net entrant pour pouvoir maintenir la dépolarisation du potentiel de membrane. Ce courant entrant est généré par les canaux ioniques de la membrane plasmique [1].

Toutefois, dans l'embryon très précoce, avant la formation des chambres cardiaques, l'automatisme du « cœur » tubulaire n'implique pas de changement du potentiel de membrane. Les myocytes du cœur embryonnaire présentent des contractions spontanées rythmiques générées par une production constitutive d'inositol triphosphate (IP3). L'activation des récepteurs à l'IP3 (IP3R) induit la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, ce qui active des contractions périodiques du cœur tubulaire [2].

Lors de la formation des chambres cardiaques, l'expression des canaux ioniques de la membrane des cellules automatiques se met en place. À la fin du développement du cœur, l'automatisme est restreint au nœud sinusal et aux myocytes du système de conduction atrio-ventriculaire. Suite à la maturation du système de conduction cardiaque et des branches sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome, les catécholamines et l'acétylcholine régulent la fréquence cardiaque en modifiant la pente de la dépolarisation diastolique [1].

MÉCANISME PACEMAKER : LA GÉNÉRATION DE LA DÉPOLARISATION DIASTOLIQUE

À des fins pédagogiques, il est possible de visualiser l'activation séquentielle des canaux ioniques au cours de l'activité automatique à l'aide de la modélisation numérique (Fig. 1B). Cet outil prédictif permet de calculer, à chaque instant, le potentiel de membrane en fonction de l'intégrale du courant total généré par l'activité des canaux ioniques. La dépolarisation

Auteur correspondant :

M.-E. Mangoni,
CNRS, Inserm, département de
physiologie, université de
Montpellier, institut de génomique
fonctionnelle, 141, rue de la
Cardonille, 34094 Montpellier,
France.
Adresse e-mail :
matteo.mangoni@igf.cnrs.fr

production d'AMPc. L'AMPc augmente l'activité des canaux f-HCN4 et le degré de phosphorylation des canaux $Ca_v1.3$, ce qui augmente le courant entrant total, accélérant la dépolarisation diastolique. D'autre part, le système parasymphatique régule négativement la fréquence cardiaque via deux mécanismes. L'activation du récepteur muscarinique M2 par l'acétylcholine active une G protéine dont le complexe des sous-unités s'ouvre directement les canaux K^+_{KACH} (Girk4). Ceci induit un courant sortant qui s'oppose aux courants entrants. De plus, l'activation du récepteur M2 décroît la production d'AMPc, ce qui réduit les courants $I_{Ca_v1.3}$ et I_f . L'augmentation d'un courant sortant associée à la diminution des courants entrants réduit la pente de la dépolarisation diastolique entraînant une baisse de la fréquence cardiaque.

LA DYSFONCTION SINUSALE : BASES GÉNÉTIQUES ET PATHOLOGIES ACQUISES

La dysfonction sinusale est définie comme l'incapacité du cœur à générer et/ou à conduire normalement l'impulsion pacemaker. Chez la plupart des patients, la dysfonction sinusale est un problème lié à l'âge. On distingue toutefois entre dysfonctions primaires ou idiopathiques (environ 20 % des patients), où la pathologie n'est pas liée à une maladie acquise et les dysfonctions secondaires (80 % des patients), qui sont associées à d'autres pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et la fibrillation atriale [11].

Au cours de la dernière décennie, les techniques de séquençage du génome humain et la génétique médicale ont permis l'identification des causes de plusieurs formes de dysfonction sinusale d'origine congénitale. En particulier, des mutations de perte de fonction dans les canaux f-HCN4 et $Ca_v1.3$ ont pu être reconnues comme responsables de la dysfonction sinusale primaire [7,11]. Dans certains cas, il a été aussi possible d'identifier des mutations dans des protéines régulatrices de ces canaux comme l'ankyrine-B [11]. Plus récemment, il a été montré qu'une mutation gain de fonction dans une G protéine est responsable d'une bradycardie congénitale par sur-activation du courant I_{KACH} . L'identification des causes génétiques de certaines formes de dysfonctions sinusales idiopathiques est intéressante sur le plan de la recherche fondamentale et clinique. Sur le plan de la recherche fondamentale, l'association entre perte de fonction d'un canal ionique et dysfonction sinusale congénitale confirment chez l'homme le modèle de génération de l'activité pacemaker obtenu grâce à la recherche fondamentale chez les modèles animaux. Sur le plan de la recherche préclinique, la génétique valide les modèles animaux de dysfonction sinusale pour explorer de nouvelles stratégies pour la prise en charge de cette pathologie.

Bien que les causes des dysfonctions sinusales secondaires restent dans la plupart des cas inconnus, des résultats très récents montrent que la dysfonction associée à l'entraînement physique excessif pourrait être provoquée par une baisse de l'expression des canaux f-HCN4. Il est important de noter aussi qu'une réduction de l'expression de HCN4 a été décrite dans un modèle animal de dysfonction sinusale associée à l'insuffisance cardiaque [11]. Ces résultats présentent un grand intérêt, car ils semblent indiquer que la baisse d'expression des canaux pacemaker pourrait

constituer un mécanisme commun entre les dysfonctions sinusales primaires et secondaires.

LE CIBLAGE DU « CANAL COMPENSATOIRE » : UNE NOUVELLE PERSPECTIVE THÉRAPEUTIQUE POUR LA PRISE EN CHARGE DE LA DYSFONCTION SINUSALE ?

La dysfonction sinusale est responsable d'environ 500 000 implantations de pacemakers en Europe. Une étude clinique indique que la fréquence de la dysfonction sinusale est destinée à doubler au cours de 50 prochaines années à cause du vieillissement de la population [12]. Bien que les pacemakers électroniques soient de plus en plus performants, ces prédictions incitent à rechercher des approches thérapeutiques complémentaires ou substitutives. Sur ce plan, les recherches en cours sur les pacemakers dits « biologiques » basés sur l'utilisation de cellules souches ou la thérapie génétique sont prometteuses [13]. Toutefois, une thérapie de type pharmacologique, rapide dans sa mise en œuvre, présenterait un intérêt certain en clinique.

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, la perte de fonction des canaux f-HCN4 et $Ca_v1.3$ induit des dysfonctions sinusales chez les souris génétiquement modifiées et chez l'homme. Nous avons montré que l'ablation génétique ou l'inhibition pharmacologique des canaux Girk4 codant pour I_{KACH} normalise la fréquence et le rythme cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et HCN4-AYA [5,14]. Nos résultats montrent que la normalisation de la fonction sinusale et l'amélioration de la conduction s'expliquent par un phénomène de rétablissement de l'équilibre entre courants entrants et sortants activés dans la dépolarisation diastolique (Fig. 1C). Nous avons appelé ce nouveau concept « ciblage du canal compensatoire » pour souligner son mécanisme de rétablissement d'un équilibre par compensation entre courants de sens opposé [8]. Ces résultats suggèrent aussi que le mécanisme responsable de la mise en place des symptômes liés à la dysfonction sinusale est l'activation des canaux Girk4 et du courant I_{KACH} . Enfin, ils indiquent la possibilité de développer une nouvelle thérapie pharmacologique ciblant les canaux Girk4 pour la prise en charge de la dysfonction sinusale. Des molécules ciblant I_{KACH} ont été développées pour la prise en charge de la fibrillation atriale. La dysfonction sinusale pourrait constituer une nouvelle indication pour ces molécules.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

RÉFÉRENCES

- [1] Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 2008;88:919–82.
- [2] Mery A, Aimond F, Menard C, Mikoshiba K, Michalak M, Puceat M. Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Mol Biol Cell* 2005;16:2414–23.
- [3] DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 2010;106:434–46.

- [4] Swedberg K, Komajda M, Bohm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2010; 376:875–85.
- [5] Mesirca P, Alig J, Torrente AG, Muller JC, Marger L, Rollin A, et al. Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of "funny" (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat Commun* 2014;5:4664.
- [6] DiFrancesco D. Funny channel gene mutations associated with arrhythmias. *J Physiol* 2013;591:4117–24.
- [7] Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front Physiol* 2015;6:19.
- [8] Mesirca P, Bidaud I, Briec F, Evain S, Torrente AG, Le Quang K, et al. G protein-gated IKACH channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113 [E932–E941].
- [9] Torrente AG, Mesirca P, Neco P, Rizzetto R, Dubel S, Barrere C, et al. L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca2+ release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 2016;109:451–61.
- [10] Toyoda F, Mesirca P, Dubel S, Ding WG, Striessnig J, Mangoni ME, et al. Cav1.3 L-type Ca2+ channel contributes to the heart-beat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na+ current. *Sci Rep* 2017;7:7869.
- [11] Monfredi O, Boyett MR. Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons: a view from the sinoatrial nodal myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2015;83:88–100.
- [12] Jensen PN, Gronroos NN, Chen LY, Folsom AR, deFilippi C, Heckbert SR, et al. Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64:531–8.
- [13] Rosen MR, Robinson RB, Brink PR, Cohen IS. The road to biological pacing. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:656–66.
- [14] Mesirca P, Bidaud I, Mangoni ME. Rescuing cardiac automaticity in L-type Cav1.3 channelopathies and beyond. *J Physiol* 2016;594:5869–79.

En tant que co-auteur avec A.G. Torrente et L. Fossier, l'étude porte sur les changements intra et extra-cellulaires de l'homéostasie calcique vis à vis des dysfonctions du NSA. Cette étude est en cours d'amélioration pour un nouvelle soumission à *Cardiovascular research..*

Hypercalcemia impairs sino-atrial automaticity through Ca_v1.2-mediated Ca²⁺ influx.

Short title: Hypercalcemia impairs sinus pacemaker activity.

Angelo G. Torrente PhD¹, *Lucile Fossier¹, *Matthias Baudot¹, Isabelle Bidaud PhD¹, Pietro Mesirca PhD¹, Matteo E. Mangoni PhD¹.

* indicates authors that contributed equally

¹Institut de Génomique Fonctionnelle, Département de Physiologie, Université de Montpellier, CNRS, Inserm, LabEx ICST, rue de la Cardonille, Montpellier, 34000 France.

Original article

Address for correspondence:

Dr. Matteo E. Mangoni

and

Dr. Angelo G. Torrente

Institute of Functional Genomics, Department of Physiology

CNRS UMR 5203, Inserm U 1191, University of Montpellier

34097 Montpellier, France

tel. +33 (0)4 34 35 92 46

e-mail: matteo.mangoni@igf.cnrs.fr and angelo.torrente@igf.cnrs.fr

Words number: 6997

Keywords: L-type Ca²⁺ channels, sino-atrial node, pacemaker activity, sinus node dysfunction, Ca²⁺-activated small-conductance K⁺ channels.

Abstract

Aims: We investigated whether hypercalcemia causes sino-atrial (SAN) dysfunctions (SNDs) and if $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels (LTCCs) are involved in the development of these dysfunctions.

Membrane currents and intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dynamics generate SAN pacemaker activity. Compromised generation or conduction of the pacemaker impulse causes SNDs. Recent studies have associated abnormal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics with SNDs. Carrying the main Ca^{2+} influx in SAN cells, $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ sustain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics. Modified extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) could alter Ca^{2+} influx. In particular, cancer and hyperparathyroidism can raise $[\text{Ca}^{2+}]_o$, causing hypercalcemia, which in turn, could remodel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics and impair SAN automaticity.

Methods and results: To test this hypothesis, we measured spontaneous contractions, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release and L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca,L}}$) in murine SAN cells. Then, we recorded rate, location and propagation of the pacemaker impulse in SAN tissues.

We observed that $I_{\text{Ca,L}}$ translates $[\text{Ca}^{2+}]_o$ modifications to the intracellular space, modulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release and SAN cells contraction. Interestingly, only $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase dysregulated pacemaker activity. The analysis of SAN cells mutated on LTCCs revealed that $\text{Ca}_v1.2$ produces the excessive Ca^{2+} influx causing pacemaker dysregulation when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increases.

$[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase to hypercalcemic levels induced arrhythmia in SAN tissues, activating ectopic leading regions of pacemaking and impairing atrial conduction. We eliminated these pacemaker dysfunctions by blocking Ca^{2+} -activated small-conductance K^+ (SK) channels.

Conclusions: Hypercalcemia causes excessive $\text{Ca}_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx, which accumulates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and could hyperactivate SK channels, leading to pacemaker impairment. Therefore, $\text{Ca}_v1.2$ or SK modulation may help reduce pacemaker dysfunctions, preventing SND progression.

1. Introduction.

The sino-atrial node (SAN) generates the pacemaker activity that triggers heartbeat¹. SAN dysfunctions (SNDs) originate from compromised pacemaker activity and can cause bradycardia, arrhythmia, atrial fibrillation and even sudden death^{2, 3}.

SNDs still have unclear origins, but cause over 250,000 pacemaker implants in Europe yearly⁴. These pacemakers require a battery replacement every 7-10 years⁵. During this period, a thick fibrotic tissue can envelope the electronic pacemakers, complicating their replacement and leading to serious inflammations. Consequently, the patients may be left without heart rate control, which constitutes a life-threatening risk⁶. Thus, despite the high performance of the electronic pacemakers, we need to investigate SNDs^{2, 3} to reduce or delay irreversible pacemaker implantations.

Transgenic mice with abnormal dynamics of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) showed that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation impairs SAN automaticity⁷⁻¹⁰. Similar observations have been made in ischemia and heart failure¹¹⁻¹⁴. Moreover, clinical reports indicated that hypercalcemic patients develop SNDs^{15, 16}.

Hypercalcemia is caused by extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) increase over 4 mmol/L in the plasma of patients¹⁷ and affects up to 1% of the population and 15% of the hospitalized patients¹⁸. Hypercalcemia often results from cancer or hyperparathyroidism^{19, 20}, which can increase bone reabsorption or intestinal absorption of Ca^{2+} ^{19, 20}. The signs of hypercalcemia include heart dysrhythmias²¹, but the association with heart rhythm diseases is unclear¹⁹. We modified $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in murine SAN cells and intact tissue, to test the effect of hypercalcemia on pacemaking.

SAN automaticity starts with the diastolic depolarization phase (DDP)¹, which allows to trigger an action potential (AP). The interplay of membrane ion channels and Ca^{2+} cycling proteins generates the DDP^{1, 22}. In particular, “funny” (f-) channels²³, $\text{Ca}_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels (LTCCs)^{24, 25}, $\text{Ca}_v3.1$ T-type Ca^{2+} channels²⁶ and the sustained Na^+ current (I_{st})²⁷ cooperate to initiate SAN depolarization¹.

Ca^{2+} cycling proteins are activated in the late DDP. During this phase, Ryanodine Receptors (RyRs) release small quantities of Ca^{2+} that activate the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX). In turn, NCX generates a depolarizing current (I_{NCX}) that helps complete the DDP^{28, 29}.

Earlier, we demonstrated that beside direct depolarization²⁴, $\text{Ca}_v1.3$ also induces local release of SR Ca^{2+} ²⁵, which may stimulate I_{NCX} helping complete the DDP. Therefore, it is expected that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase enhances I_{NCX} , boosting SAN automaticity²².

The SAN LTCCs, $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$, are activate upon depolarization²⁴ and have different cellular locations³⁰. $\text{Ca}_v1.3$ is the predominant SAN isoform and activates more negatively than $\text{Ca}_v1.2$ ²⁴. In SAN cells, Ca^{2+} influx through both these channel isoforms potentially links variations of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and allows to reload the SR and sustain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics at each AP cycle²⁴.

To understand the effect of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ on SAN automaticity, we recorded cell shortening, L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca,L}$) and the spontaneous rate in single cells and SAN tissues. We also obtained SAN cells from mice knockout (KO) for $\text{Ca}_v1.3$ ($\text{Ca}_v1.3^{-/-}$)³¹ or carrying dihydropyridine-insensitive $\text{Ca}_v1.2$ channels ($\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$)³², to distinguish $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ contribution to pacemaking, under abnormal $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase.

Given the different activation²⁴ and locations³⁰ of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$, they could play distinct roles, boosting SAN automaticity or inducing SNDs in hypercalcemic patients^{15, 16}. Here we show that hypercalcemia impairs SAN automaticity through excessive $\text{Ca}_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx.

Hypercalcemia has been associated with cell hyperpolarization³³. Since Ca^{2+} -activated K^+ channels can lead to cell hyperpolarization^{34, 35}, we investigated whether these channels could be involved in the hypercalcemia-mediated impairment of SAN pacemaking. Ca^{2+} -activated K^+ channels have been implicated in the pacemaker mechanism of mice and human^{9, 35, 36}. In

particular, Ca^{2+} -activated small K^+ (SK) channels are voltage independent, cause pacemaker impairment when hyperactivated³⁵ and may interact with $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v1.2$ ^{37, 38}.

We found that SK inhibition eliminates the hypercalcemia-mediated impairment of SAN pacemaking. Therefore, we established a direct link between hypercalcemia, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation and SNDs that seems to involve SK hyperactivation.

2. Materials and methods.

Detailed methods can be found in the online supplement. The investigation conforms to the European directives (2010/63/EU) for the Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the French Ministry of Agriculture (N° D34-172-13). In brief, we used $\text{Ca}_v1.3^{-/-31}$ and $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-1-32}}$ mice, and we employed $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ littermates lacking the mutated gene ($\text{Ca}_v1.3^{+/+}$) as wild type (WT) mice. These mice were dissected to obtain the entire SAN/atrial preparation (SAN plus right and left atria)¹⁰ and freshly isolated SAN cells²⁵.

Through a video detector (IonOptix; Milton, MA) we recorded beat rate and the amplitude of cell shortening in single SAN cells. The same cells were charged with the Ca^{2+} dye Fura-2 and analyzed with a fluorescence photomultiplier (IonOptix; Milton, MA) to quantify $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In these cells, we also recorded $I_{\text{Ca,L}}$ by patch-clamp.

The intact SAN/atrial preparation was pinned in an optical chamber and charged with the voltage probe Di-4-ANEPPS. These samples were imaged with the MiCAM Ultima-L CMOS camera (SciMedia; Costa Mesa, CA) to perform optical mapping of the membrane voltage. This technique recorded APs rate, the location of the pacemaker leading region and the impulse propagation through atria.

Statistical tests are indicated in the figure legends and their results were considered significant when $p < 0.05$. When specified, n corresponds to the number of cells and N to the number of animals.

3. Results.

3.1 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase dysregulates the spontaneous activity of SAN cells.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics are essential to generate SAN automaticity^{10, 25}. However, it is unknown how $[\text{Ca}^{2+}]_o$ affects $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and SAN automaticity. To identify how $[\text{Ca}^{2+}]_o$ affects the spontaneous rate of SAN cells, avoiding Ca^{2+} buffering due to Ca^{2+} dyes, we video recorded coordinated contractions of SAN cells by edge detection (Fig. 1A and B and Suppl. movie 1)³⁹.

1.8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ is classically used to study SAN cells^{7, 24, 25, 40} and is similar to the range of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in the plasma of patients (2 to 2.5 mmol/L)¹⁵⁻¹⁷. The decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to 0.9 mmol/L reduced the amplitude of cell shortening, while 3 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increased it (Fig. 1B and C). These $[\text{Ca}^{2+}]_o$ modifications did not change the average spontaneous rate of SAN cells (Fig. 1D). However, 3 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ dysregulated the beating rhythm of SAN cells, increasing the occurrence of automatic pauses (Fig. 1E and F).

Consistent with previous data in atrial myocytes⁴¹, $[\text{Ca}^{2+}]_o$ modulates the amplitude of cell shortening in SAN cells. However, only $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase dysregulates automaticity (Fig. 1B and E), similarly to data reported after digoxigenin intoxication or disturbance of electrolytes homeostasis in SAN cells^{42, 43}.

3.2 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ regulates cytosolic and SR levels of Ca^{2+} in SAN cells.

Our edge detection experiments prove that $[\text{Ca}^{2+}]_o$ affects the Ca^{2+} available for the spontaneous contractions of SAN cells⁴¹, but did not quantify $[\text{Ca}^{2+}]_i$. To this end, we used the ratiometric Ca^{2+} dye Fura-2⁴¹.

The spontaneous rate of SAN cells influences cytosolic and SR Ca^{2+} levels⁴⁴. As we have done earlier, we recorded Ca^{2+} transients during field stimulation at 2 Hz (Fig. 2A), to stabilize

[Ca²⁺]_i dynamics²⁵. This frequency is similar to the average spontaneous rate that we recorded in SAN cells (Fig. 1D). [Ca²⁺]_o increase from 0.9 to 3 mmol/L augmented the level of diastolic Ca²⁺ and the amplitude of Ca²⁺ transients (Fig. 2A and B), validating our cell-shortening data and agreeing with previous tests in ventricular myocytes⁴⁵. In addition, simultaneous recording confirmed that cell shortening and Ca²⁺ transients corresponded, at every [Ca²⁺]_o tested (Suppl. Fig. 1).

Next, we estimated the SR Ca²⁺ load by fast application of caffeine (10 mmol/L)²⁵. We found that the SR Ca²⁺ load augmented when we increased [Ca²⁺]_o (Fig. 2C and D). This caffeine protocol also showed similar NCX activity under all [Ca²⁺]_o tested (Fig. 2C and D). Indeed, caffeine locks open RyRs, impeding the reuptake of Ca²⁺ by the SR Ca²⁺-ATPase pump. Consequently, NCX activity extrudes almost all the Ca²⁺ released by RyRs in the cytoplasm and can be measured as the time course of decay (Tau) of the caffeine-induced Ca²⁺ transients⁴⁵.

These results demonstrated that [Ca²⁺]_o controls: 1) diastolic Ca²⁺, 2) SR Ca²⁺, and 3) the amplitude of Ca²⁺ transients. In contrast, NCX activity appeared unrelated to [Ca²⁺]_o.

3.3 [Ca²⁺]_o modulates L-type Ca²⁺ current.

Given that LTCCs generate the main Ca²⁺ influx in SAN cells^{24, 25}, we investigated whether [Ca²⁺]_o affects *I*_{Ca,L} to regulate [Ca²⁺]_i dynamics.

0.9 mmol/L of [Ca²⁺]_o decreased *I*_{Ca,L} while 3 mmol/L increased it (Fig. 3A and B). Since only 3 mmol/L of [Ca²⁺]_o affected the automaticity of SAN cells, under this condition, we tried to separate Ca_v1.2 and Ca_v1.3-mediated *I*_{Ca,L} by using Ca_v1.2^{DHP-/-} SAN cells. Despite the mutation that renders Ca_v1.2 insensitive to dihydropyridines in these cells, this channel maintains unaltered all its other characteristics^{30, 32}.

Dihydropyridines are specific modulators of *I*_{Ca,L}. Using Ca_v1.2^{DHP-/-} SAN cells, we quantified Ca_v1.3-mediated *I*_{Ca,L} as the current sensitive to the dihydropyridine antagonist nifedipine. In Ca_v1.2^{DHP-/-} SAN cells, 3 mmol/L [Ca²⁺]_o increased *I*_{Ca,L} at both late diastolic (-35 mV) and upstroke (+10 mV) voltages (Fig. 3C and D). The subsequent superfusion of nifedipine (3 μmol/L) reduced *I*_{Ca,L} at both voltages, indicating the presence of a Ca_v1.3-mediated current (Fig. 3C and D). Consistently with the activation threshold of Ca_v1.3²⁴, at -35 mV the % of Ca_v1.3-mediated *I*_{Ca,L} was higher than Ca_v1.2 (Fig. 3E). Nevertheless, when looking at the real value of *I*_{Ca,L} conductance, induced by 3 mmol/L [Ca²⁺]_o, the predominant influx of Ca²⁺ was carried by Ca_v1.2 at +10 mV (Fig. 3F).

We employed this strategy because genetic ablation of Ca_v1.2 is embryonically lethal⁴⁶, and there are no drugs to selectively target Ca_v1.2 or Ca_v1.3 activity. These results prove that Ca_v1.2 and Ca_v1.3 channels translate the modification of [Ca²⁺]_o to the intracellular space, similarly to results obtained in rabbit SAN cells⁴⁰. Moreover, we demonstrated that 3 mmol/L of [Ca²⁺]_o increases [Ca²⁺]_i predominantly through Ca_v1.2.

3.4 Ca_v1.2 and Ca_v1.3-mediated Ca²⁺ influx differently contribute to SAN automaticity.

We showed different densities for Ca_v1.2 and Ca_v1.3-mediated *I*_{Ca,L}. Yet, we could not distinguish how Ca_v1.2 or Ca_v1.3 modulate the activity of SAN cells under abnormal [Ca²⁺]_o increase. This distinction was made possible by superfusing Ca_v1.2^{DHP-/-32} and Ca_v1.3^{-/-31} SAN cells with the dihydropyridine agonist of LTCCs Bay K8644 (BayK; 1 μmol/L).

The direct effect of BayK is to increase *I*_{Ca,L}²⁴. This drug improved the spontaneous rate of SAN cells exposed to 3 mmol/L [Ca²⁺]_o, but did not recover the arrhythmic pattern of Ca_v1.3^{-/-} cells (Fig. 4A, B and C), where only Ca_v1.2 is expressed and stimulated by the drug. In addition, BayK increased the amplitude of cell shortening in WT and Ca_v1.3^{-/-}, but not in Ca_v1.2^{DHP-/-} SAN cells (Fig. 4A and D), where only Ca_v1.3 is stimulated. Concomitant quantification of [Ca²⁺]_i showed that BayK increased the amplitude of Ca²⁺ transients in WT and Ca_v1.3^{-/-}, but not in Ca_v1.2^{DHP-/-} SAN cells (Suppl. Fig.2). Thus, Ca_v1.2 was essential to increase the amplitude of Ca²⁺ transients even

when BayK stimulated $\text{Ca}_v1.3$. On the other hand, BayK increased diastolic Ca^{2+} in SAN cells of our three genotypes (Suppl. Fig.2).

Control experiments confirmed that in the absence of dihydropyridines, $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ cells behave like WT under all $[\text{Ca}^{2+}]_o$ tested (Fig. 5, table 1 and Suppl. Fig. 3). Also $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ cells had cell shortening and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics similar to WT (Fig. 5, table 1 and Suppl. Fig. 3), but showed slower spontaneous rate (Fig. 5 and table 1), as we already reported²⁵. Moreover, $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ cells improved their spontaneous rate when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ decreased at 0.9 while impaired it at 3 mmol/L (Fig. 5 and table 1).

In line with our earlier results²⁵, we reported the need of $\text{Ca}_v1.3$ to increase and regularize the automaticity of SAN cells. Conversely, $\text{Ca}_v1.2$ was required to sustain the generation of Ca^{2+} transients and cell contraction. The distinction of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ role could explain the SAN dysregulation, caused by $I_{\text{Ca,L}}$ increase, under 3 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Fig. 1). Indeed, the strong impairment of automaticity when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increases in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ cells, and its improvement under $[\text{Ca}^{2+}]_o$ decreases, indicate that $\text{Ca}_v1.2$ carry the Ca^{2+} influx responsible of these pacemaker modulations (Fig. 5 and table 1).

3.5 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase impairs impulse generation and propagation in the SAN tissue.

Our experiments demonstrated that high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ dysregulates SAN cells automaticity through $\text{Ca}_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx. We then studied the impact of high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ on SAN tissues by increasing $[\text{Ca}^{2+}]_o$ to the hypercalcemic concentration of 4.8 mmol/L¹⁷.

We analyzed the pacemaker activity of the intact SAN/atria preparations by optical mapping of the membrane voltage¹⁰. This technique allows to record modification of the membrane potential such as APs, as well as the leading site of SAN depolarization and its atrial conduction¹⁰. The pacemaker activity of the intact SAN was not affected by 0.9 or 4.8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Suppl. Fig. 4). However, we noticed that 4.8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ tended to decrease the AP rate and to increase the coefficient of variability (Suppl. Fig. 4).

Quick change of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ may not be enough to trigger SAN impairment, in comparison to the prolonged alteration of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in hypercalcemic patients. Thus, we tested more severe $[\text{Ca}^{2+}]_o$ changes (0.45 or 8 mmol/L; Fig. 6) to investigate the presence of SND hallmarks⁴². In particular, we chose 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$, because in SAN fibers of rabbit, this $[\text{Ca}^{2+}]_o$ affects the generation of APs⁴⁷, which could lead to arrhythmia.

0.45 mmol/L slightly decreased AP rate in SAN tissues but did not affect their rhythmicity (Fig. 6A, D and E). In contrast, 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ activated ectopic pacemaker sites in the caudal area of the SAN, leading to episodes of arrhythmia (Fig. 6). This $[\text{Ca}^{2+}]_o$ modification also slowed down or blocked atrial conduction (Fig. 6, and Suppl. Fig. 5A), and in one-third of the SAN tissues (N=15) generated delayed afterdepolarizations (DADs; Fig. 6A and Suppl. Fig. 5). The episodic nature of the arrhythmias recorded under 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ did not change the average AP rate of SAN tissues (Fig. 6D and Suppl. Fig. 6).

To further explore whether hypercalcemia affects pacemaker activity, we measured the sinus recovery time (SNRT; Suppl. Fig. 7)¹⁰, following overdrive suppression of automaticity⁴⁸. Indeed, atria stimulation at high rates transiently suppresses the SAN impulse. The interval between the end of stimulation and the first spontaneous AP is often used in clinic as an index to detect SNDs⁴⁸. Thus, we stimulated the entire SAN/atria preparation at 16 Hz (Suppl. Fig. 7A) and we found that SNRT was reduced by 0.45 mmol/L and prolonged by 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Suppl. Fig. 7).

The clear hallmarks of SNDs under hypercalcemia are similar to the effect of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation on SAN pacemaking in transgenic models of NCX KO¹⁰, RyR-mediated Ca^{2+} leak^{7, 8}, or digoxin intoxication⁴². Thus we discovered a previously unknown link between $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation and SNDs.

3.6 Apamin recovers SNDs induced by hypercalcemia.

We demonstrated that excessive Ca^{2+} influx through $\text{Ca}_v1.2$ channels impairs SAN pacemaker activity, but we still do not know through which mechanism.

Excessive $\text{Ca}_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx could modulate SK channels. Indeed, SK channels are voltage independent and directly activated by Ca^{2+} ³⁵, and potentially interact with $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ channels^{37, 38}. Moreover, it has been demonstrated that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase hyperactivates SK channels, causing cell hyperpolarization and impairment of SAN activity³⁵.

Thus, we superfused SAN tissues previously exposed to 8 mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_o$ with a saturating dose of the specific SK blocker Apamin (100 nmol/L; Fig. 7). This drug 1) eliminated the episodes of arrhythmia, 2) decreased the coefficient of variability (Fig. 7A, D and Suppl. Fig. 6), 3) relocated the leading regions to the frontal SAN (Fig. 7B), and 4) prevented the generation of DADs (0 DADs/min; N=15). In contrast, we did not find significant changes in the impaired atrial conduction (Fig. 7E and F).

In conclusion, SK channels could be the downstream effector of excessive Ca^{2+} influx, as their inhibition recovers the impairment of pacemaker activity induced by hypercalcemia.

4. Discussion.

We observed that the modification of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ controls: 1) $I_{Ca,L}$, 2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics and 4) cell contraction. Moreover, we demonstrated that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_o$ dysregulates automaticity in SAN cells and causes the hallmarks of SNDs in the intact tissue. These results agree with the evidence of SNDs reported in transgenic mice and patients affected by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation or hypercalcemia⁷⁻¹⁶. They also concur with the pacemaker impairment induced by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation in mice lacking NCX¹⁰, Calsequestrin 2⁸, or carrying leaky RyR⁷ and under abnormal Na^+/K^+ pump activity⁴³ or digitalis intoxication of the SAN^{42, 43}.

Using $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ SAN cells we showed that under $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase, $\text{Ca}_v1.2$ conducts excessive Ca^{2+} influx, which causes pacemaker impairment. This impairment was accentuated by the absence of $\text{Ca}_v1.3$ (Fig. 5). On the other hand, selective stimulation of $\text{Ca}_v1.3$ with BayK improves the automaticity of SAN cells exposed to $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase (Fig. 4). In contrast, $\text{Ca}_v1.2$ stimulation provided the Ca^{2+} influx necessary to generate Ca^{2+} transients and cell contraction (Fig. 4 and Suppl. Fig. 2).

This separation of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ -mediated Ca^{2+} influx explains $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -induced SNDs and Ca^{2+} -mediated increase of SAN automaticity²². Indeed, $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increase in WT cells likely causes $\text{Ca}_v1.2$ -mediated accumulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pacemaker dysregulation. This dysregulation could be partially counterbalanced by $\text{Ca}_v1.3$ depolarization and the indirect stimulation of I_{NCX} . Conversely, under excessive or prolonged $[\text{Ca}^{2+}]_o$ increases, the $\text{Ca}_v1.2$ -mediated accumulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could prevail over the depolarizing effect of $\text{Ca}_v1.3$, leading to pacemaker dysregulation, arrhythmia and ultimately to SNDs.

In mice lacking NCX¹⁰ or Calsequestrin 2⁸ it has been hypothesized that the activation of apoptotic pathways by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation causes pacemaker and conduction impairment^{8, 10}. Given that we imposed acute hypercalcemia, its effects on SAN pacemaking cannot be attributed to tissue fibrosis.

Hypercalcemia has been associated with cell hyperpolarization⁴⁹. Thus, we investigated membrane channels directly activated by Ca^{2+} and that can cause cell hyperpolarization. SK channels are activated by Ca^{2+} and hyperactivate when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulates in SAN cell lacking NCX³⁵. Consistent with these properties, by inhibiting SK channels we recovered the hallmarks of SNDs induce by hypercalcemia in the intact SAN tissue. Therefore, we propose a direct involvement of hypercalcemia and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accumulation in SND onset, likely through the hyperactivation of SK channels.

4.1 Abnormal $[Ca^{2+}]_o$ affects spontaneous activity and Ca^{2+} load of SAN cells.

Under 0.9 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$, $I_{Ca,L}$ decreases, reducing diastolic Ca^{2+} , the amplitude of Ca^{2+} transients and cell shortening. However, this $[Ca^{2+}]_o$ did not change the spontaneous beat rate of SAN cells. Earlier, we showed that $Ca_v1.3$ channels contribute to pacemaking also by generating the Na^+ current I_{st}^{27} , which is insensitive to $[Ca^{2+}]_o$ reduction²⁷. Thus, I_{st} could compensate for the negative chronotropic effect of $[Ca^{2+}]_o$ decrease and explain the limited sensitivity of SAN automaticity to 0.9 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$.

Under 3 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$, $I_{Ca,L}$ increases, raising diastolic Ca^{2+} , the amplitude of Ca^{2+} transients and cell shortening. This condition also dysregulated cell automaticity and increased occurrence of pauses in SAN cells. Moreover, in $Ca_v1.3^{-/-}$ cells exposed to 3 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$, the selective increase in $Ca_v1.2$ -mediated $I_{Ca,L}$ strongly impaired SAN automaticity, while $I_{Ca,L}$ decrease improved it.

Thus, we demonstrated a strong link between $[Ca^{2+}]_o$, $[Ca^{2+}]_i$ and pacemaker activity. Furthermore, we showed that excessive $Ca_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx causes $[Ca^{2+}]_i$ accumulation, which in turn impairs SAN automaticity.

4.2 $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ -mediated Ca^{2+} influxes intervene in different SAN mechanisms.

We have reported previously that $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels have different membrane locations in SAN cells. They both co-localize with RyRs, but $Ca_v1.3$ is located along the z-line, while $Ca_v1.2$ is located on the cell edge³⁰. These distinct locations could subdivide $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ -mediated Ca^{2+} influxes into separate cell compartments, allowing these channels to play different roles in SAN automaticity and contraction.

Here, we confirmed that $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ prevails over $Ca_v1.2$ during the DDP^{24, 25}, executing its depolarization function. We also demonstrated that $Ca_v1.2$ -mediated $I_{Ca,L}$ is the predominant Ca^{2+} influx of the AP. SAN cells did not require $Ca_v1.2$ -mediated $I_{Ca,L}$ to increase their automaticity when $Ca_v1.3$ was stimulated by BayK (Fig. 4, $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$). On the contrary, the stimulation of $Ca_v1.2$ was necessary to sustain the generation of Ca^{2+} transients and cell contraction, even when $Ca_v1.3$ channels were stimulated by BayK (Suppl. Fig. 2 and Fig. 4, $Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$).

From a pharmacological perspective these results could open the way to treatment targeting only $Ca_v1.3$ to control heart rate without impairing SAN/atrial contractility.

4.3 Hypercalcemia impairs pacemaker generation and propagation.

Severe changes in $[Ca^{2+}]_o$ affect the automaticity of the intact SAN. 0.45 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ could slow down SAN rate as a consequence of an excessive reduction in SR Ca^{2+} load. In contrast, $[Ca^{2+}]_o$ increase to 8 mmol/L induces episodes of arrhythmia that result from the activation of pacemaker leading regions outside the normal SAN area. These ectopic delocalization of the leading regions is directed toward the caudal area of the SAN, which is known to generate slower and arrhythmic pacemaker activity⁵⁰.

SNRT recordings further prove the deleterious effect of hypercalcemia on SAN activity. Indeed, 0.45 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ shortened SNRT while 8 mmol/L prolonged it. $[Ca^{2+}]_o$ increase also slowed down or even blocked atrial conduction, possibly, as a consequence of Ca^{2+} -dependent inactivation of gap junctions⁵¹ or increased intercellular resistance^{52, 53}.

Longer SNRT, impairment of atrial conduction and ectopic delocalization of the pacemaker leading regions, are typical hallmarks of SNDs. These hallmarks were previously recorded after $[Ca^{2+}]_i$ increase and have been related to fibrotic SAN degeneration due to cellular apoptosis^{8, 10, 42}. Yet, the link between apoptosis and SNDs is unclear. Since 8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ quickly affects SAN automaticity, we propose that hypercalcemia or other types of chronic $[Ca^{2+}]_i$ accumulation could directly cause SNDs and eventually induce Ca^{2+} -mediated apoptosis as a secondary long-term consequence.

Thus, our results directly correlate $[Ca^{2+}]_i$ accumulation to SNDs, providing insights for the SND development in hypercalcemic patients and supporting the evidence of Ca^{2+} -mediated impairment of automaticity in ischemia and heart failure¹¹⁻¹⁴.

4.4 SK inhibition rescues Ca^{2+} -induced SNDs.

We demonstrated that SK inhibition eliminates arrhythmias and relocates the ectopic leading regions shifted by hypercalcemia. According to this result, in NCX KO mice $[Ca^{2+}]_i$ accumulation dysregulates SAN automaticity due to SK hyperactivation^{10, 35}. Indeed, this hyperactivation gradually hyperpolarizes membrane voltage, causing pauses in SAN automaticity^{10, 34, 35}.

We observed excessive $Ca_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx under $[Ca^{2+}]_o$ increase. Moreover, in $Ca_v1.3^{-/-}$ cells, the stronger impairment of automaticity caused by $[Ca^{2+}]_o$ increase, indicates the involvement of $Ca_v1.2$ in this pacemaker dysregulation. In atrial and pancreatic β - cells, SK channels co-localize with $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ and are modulated by $I_{Ca,L}$ ^{37, 38}. Thus, similar coupling could be hypothesized in SAN cell.

Overall, our results suggest that excessive $Ca_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx hyperactivates SK channels, leading to pacemaker dysregulation. These hypothesis may also explain the arrhythmias caused by gain-of-function mutation of $Ca_v1.2$ in Timothy syndrome⁵⁴⁻⁵⁶.

SK inhibition did not improve atrial conduction. Our results thus indicate that SK channels are involved only in the Ca^{2+} -mediated impairment of pacemaking and not in the mechanism that compromised atrial conduction.

5. Conclusions.

Ca^{2+} is an important messenger involved in the regulatory pathways of SAN pacemaking. In particular, Ca^{2+} influx, uptake and compartmentalization regulates $[Ca^{2+}]_i$ dynamics⁵⁷. Our results prove that 1) $[Ca^{2+}]_o$ controls $[Ca^{2+}]_i$ through $I_{Ca,L}$, 2) $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels play distinct roles in SAN automaticity and cell contraction, 3) hypercalcemia impairs pacemaker activity through excessive $Ca_v1.2$ -mediated Ca^{2+} influx and $[Ca^{2+}]_i$ accumulation and 4) Ca^{2+} -induced dysfunction of SAN automaticity involves SK channels. We thus demonstrate a previously unknown role of Ca^{2+} in the etiology of SNDs⁵⁸. Furthermore, we suggest that pharmacological modulation of $Ca_v1.2$ and/or SK channels could prevent SNDs caused by hypercalcemia or other sources of $[Ca^{2+}]_i$ accumulation. Finally, given the wide panel of patients potentially affected by hypercalcemia¹⁸, our result could explain part of the numerous idiopathic cases of SND².

6. Funding.

This work was supported by a research fellowship from the “*Fondation pour la Recherche Médicale, Aide au retour en France*” [to A.G.T.], a research fellowship from the “*Fondation Lefoulon-Delalande’s*” [to A.G.T.], a research grant from the *European Society of Cardiology* [to A.G.T.], and *Agence Nationale pour la Recherche* [grant ANR-15-CE14-0004-02 and ANR-13-BSV1-023, to M.E.M.]. The IGF group is member of the Laboratory of Excellence “*Ion Channel Science and Therapeutics*”, which is supported by the ANR [ANR-11-LABX-0015].

7. Acknowledgements.

We are thankful to Brady Okura, Toshiki Sakuraba and Kenji Tsubokura from SciMedia and Brainvision for their technical support of the optical mapping experiments. We are indebted to Jörg Striessnig for the mouse models used. We also thank the staff of the RAM I-Explore animal facility of Montpellier for their assistance and mouse management, Christian Barrère for helping with the IonOptix system, the MRI Imaging facility (BioCampus UMS3426) for their support in the installation and maintenance of the optical mapping system, and Semyon Kronrod and Stefan Dubel for English-language revision.

8. Conflict of interest: None declared.

9. Bibliography

1. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 2008;**88**:919-982.
2. Semelka M, Gera J, Usman S. Sick sinus syndrome: a review. *Am Fam Physician* 2013;**87**:691-696.
3. Adán V, Crown LA. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician* 2003;**67**:1725-1732.
4. Raatikainen MJ, Arnar DO, Zeppenfeld K, Merino JL, Levya F, Hindriks G, Kuck KH. Statistics on the use of cardiac electronic devices and electrophysiological procedures in the European Society of Cardiology countries: 2014 report from the European Heart Rhythm Association. *Europace* 2015;**17 Suppl 1**:i1-75.
5. Proclemer A, Zecchin M, D'Onofrio A, Botto GL, Rebellato L, Ghidina M, Bianco G, Bernardelli E, Pucher E, Gregori D. [The pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator registry of the Italian Association Arrhythmology Cardiac Pacing and cardiac pacing - annual report 2013]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2014;**15**:638-650.
6. Cingolani E, Goldhaber JJ, Marbán E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers. *Nat Rev Cardiol* 2018;**15**:139-150.
7. Neco P, Torrente AG, Mesirca P, Zorio E, Liu N, Priori SG, Napolitano C, Richard S, Benitah JP, Mangoni ME, Gómez AM. Paradoxical effect of increased diastolic Ca(2+) release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2012;**126**:392-401.
8. Glukhov AV, Kalyanasundaram A, Lou Q, Hage LT, Hansen BJ, Belevych AE, Mohler PJ, Knollmann BC, Periasamy M, Györke S, Fedorov VV. Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex. *Eur Heart J* 2013.
9. Haron-Khun S, Weisbrod D, Bueno H, Yadin D, Behar J, Peretz A, Binah O, Hochhauser E, Eldar M, Yaniv Y, Arad M, Attali B. SK4 K(+) channels are therapeutic targets for the treatment of cardiac arrhythmias. *EMBO Mol Med* 2017;**9**:415-429.
10. Torrente AG, Zhang R, Zaini A, Giani JF, Kang J, Lamp ST, Philipson KD, Goldhaber JJ. Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:9769-9774.
11. Chang SL, Chuang HL, Chen YC, Kao YH, Lin YK, Yeh YH, Chen SA, Chen YJ. Heart failure modulates electropharmacological characteristics of sinoatrial nodes. *Exp Ther Med* 2017;**13**:771-779.
12. Sanders P, Kistler PM, Morton JB, Spence SJ, Kalman JM. Remodeling of sinus node function in patients with congestive heart failure: reduction in sinus node reserve. *Circulation* 2004;**110**:897-903.
13. Du YM, Nathan RD. Ionic basis of ischemia-induced bradycardia in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 2006.
14. Kojima A, Matsumoto A, Nishida H, Reien Y, Iwata K, Shirayama T, Yabe-Nishimura C, Nakaya H. A protective role of Nox1/NADPH oxidase in a mouse model with hypoxia-induced bradycardia. *J Pharmacol Sci* 2015;**127**:370-376.
15. Shah AP, Lopez A, Wachsner RY, Meymandi SK, El-Bialy AK, Ichiuji AM. Sinus node dysfunction secondary to hyperparathyroidism. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;**9**:145-147.
16. Carpenter C, May ME. Case report: cardiotoxic calcemia. *Am J Med Sci* 1994;**307**:43-44.
17. Agaimy A, Strobel D, Strecker T. SMARCA4-Deficient Carcinoma of Unknown Primary Presenting with Fatal Paraneoplastic Hypercalcemia in a Heart Transplant Recipient: First Report in a Male Patient. *Case Rep Pathol* 2017;**2017**:9403467.

18. Streeten EA, Jaimungal S. Chapter 41 - The Differential Diagnosis of Hypercalcemia. In: Bilezikian JP, ed. *The Parathyroids (Third Edition)*. San Diego: Academic Press, 2015:607-616.
19. Badertscher E, Warnica JW, Ernst DS. Acute hypercalcemia and severe bradycardia in a patient with breast cancer. *CMAJ* 1993;**148**:1506-1508.
20. Bilezikian JP. Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2018.
21. McMahon GT. Hypercalcemia. In: Mushlin SB, Greene HL, eds. *Decision Making in Medicine (Third Edition)*. Philadelphia: Mosby, 2010:134-135.
22. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res* 2010;**106**:659-673.
23. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 2010;**106**:434-446.
24. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:5543-5548.
25. Torrente AG, Mesirca P, Neco P, Rizzetto R, Dubel S, Barrere C, Sinegger-Brauns M, Striessnig J, Richard S, Nargeot J, Gomez AM, Mangoni ME. L-type Cav1.3 Channels Regulate Ryanodine Receptor-dependent Ca²⁺ Release during Sino-Atrial Node Pacemaker Activity. *Cardiovascular Research, Cardiovasc Res*. 2016.
26. Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca_v3.1/α1G T-type calcium channels. *Circ Res* 2006;**98**:1422-1430.
27. Toyoda F, Mesirca P, Dubel S, Ding WG, Striessnig J, Mangoni ME, Matsuura H. Ca_v1.3 L-type Ca(2+) channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na(+) current. *Sci Rep* 2017;**7**:7869.
28. Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ Res* 2002;**90**:73-79.
29. Sanders L, Rakovic S, Lowe M, Mattick PA, Terrar DA. Fundamental importance of Na⁺-Ca²⁺ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. *J Physiol* 2006;**571**:639-649.
30. Christel CJ, Cardona N, Mesirca P, Herrmann S, Hofmann F, Striessnig J, Ludwig A, Mangoni ME, Lee A. Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2012;**590**:6327-6342.
31. Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 2000;**102**:89-97.
32. Sinegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, Renstrom E, Wietzorrek G, Berjukov S, Cavalli M, Walter D, Koschak A, Waldschutz R, Hering S, Bova S, Rorsman P, Pongs O, Singewald N, Striessnig JJ. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* 2004;**113**:1430-1439.
33. Yee J. Hypercalcemia. In: Enna SJ, Bylund DB, eds. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. New York: Elsevier, 2007:1-6.
34. Engel J, Schultens HA, Schild D. Small conductance potassium channels cause an activity-dependent spike frequency adaptation and make the transfer function of neurons logarithmic. *Biophys J* 1999;**76**:1310-1319.

35. Torrente AG, Zhang R, Wang H, Zaini A, Kim B, Yue X, Philipson KD, Goldhaber JI. Contribution of small conductance K(+) channels to sinoatrial node pacemaker activity: insights from atrial-specific Na(+) /Ca(2+) exchange knockout mice. *J Physiol* 2017;**595**:3847-3865.
36. Lai MH, Wu Y, Gao Z, Anderson ME, Dalziel JE, Meredith AL. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;**307**:H1327-1338.
37. Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, Knowlton AA, Chiamvimonvat N. Molecular coupling of a Ca²⁺-activated K⁺ channel to L-type Ca²⁺ channels via alpha-actinin2. *Circ Res* 2007;**100**:112-120.
38. Wang Y, Jarrard RE, Pratt EP, Guerra ML, Salyer AE, Lange AM, Soderling IM, Hockerman GH. Uncoupling of Cav1.2 from Ca(2+)-induced Ca(2+) release and SK channel regulation in pancreatic β -cells. *Mol Endocrinol* 2014;**28**:458-476.
39. Monfredi O, Tsutsui K, Ziman BD, Stern MD, Lakatta EG, Maltsev VA. Electrophysiological heterogeneity of pacemaker cells in rabbit intercaval region, including SA node: insights from recording multiple ion currents in each cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017:ajpheart.00253.02016.
40. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**395**:233-253.
41. Lezcano N, Mariángelo JIE, Vittone L, Wehrens XHT, Said M, Mundiña-Weilenmann C. Early effects of Epac depend on the fine-tuning of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2017.
42. Gonzalez MD, Vassalle M. Role of oscillatory potential and pacemaker shifts in digitalis intoxication of the sinoatrial node. *Circulation* 1993;**87**:1705-1714.
43. Lu YY, Cheng CC, Chen YC, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Electrolyte disturbances differentially regulate sinoatrial node and pulmonary vein electrical activity: A contribution to hypokalemia- or hyponatremia-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2016;**13**:781-788.
44. Verkerk AO, van Borren MM, van Ginneken AC, Wilders R. Ca(2+) cycling properties are conserved despite bradycardic effects of heart failure in sinoatrial node cells. *Front Physiol* 2015;**6**:18.
45. Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. Coordinated control of cell Ca(2+) loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-type Ca(2+) current. *Circ Res* 2001;**88**:195-201.
46. Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F. Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 2000;**275**:39193-39199.
47. SEIFEN E, SCHAER H, MARSHALL JM. EFFECT OF CALCIUM ON THE MEMBRANE POTENTIALS OF SINGLE PACEMAKER FIBRES AND ATRIAL FIBRES IN ISOLATED RABBITS ATRIA. *Nature* 1964;**202**:1223-1224.
48. Lou Q, Glukhov AV, Hansen B, Hage L, Vargas-Pinto P, Billman GE, Carnes CA, Fedorov VV. Tachy-brady arrhythmias: the critical role of adenosine-induced sinoatrial conduction block in post-tachycardia pauses. *Heart Rhythm* 2013;**10**:110-118.
49. Yee J. Reference Module in Biomedical Sciences xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. 2007.
50. Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ, Bouman LN. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:40-50.
51. Zou J, Salarian M, Chen Y, Veenstra R, Louis CF, Yang JJ. Gap junction regulation by calmodulin. *FEBS Lett* 2014;**588**:1430-1438.
52. Weingart R. The actions of ouabain on intercellular coupling and conduction velocity in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 1977;**264**:341-365.

Figure Legends

Fig. 1: Spontaneous contractions of SAN cells. **A:** Example of a single SAN cell, showing in clear blue the cursors used to measure cell shortening (See Suppl. Movie 1). **B:** Traces of spontaneous cell shortening in SAN cells, under different $[Ca^{2+}]_o$. **C-F:** Cell shortening, beat rate, pauses per min and coefficient of variability of the inter-beat interval, under the conditions in **B** (n=53, N=8). Statistics: One-way Anova followed by Tukey's multi comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Fig. 2: Quantification of $[Ca^{2+}]_i$ in SAN cells. **A:** Sample traces of Ca^{2+} transients measured by Fura-2 in SAN cells paced at 2 Hz. Note the variation of diastolic (basal) Ca^{2+} and the amplitude of Ca^{2+} transients under different $[Ca^{2+}]_o$. Insets of Ca^{2+} transients correspond to the braces on the main trace. **B:** Diastolic Ca^{2+} and amplitude of Ca^{2+} transients, under the conditions in **A** (n=17, N=3). **C:** Sample traces showing caffeine (10 mmol/L) induced Ca^{2+} transients under different $[Ca^{2+}]_o$, in SAN cells continuously paced at 2 Hz. **D:** Amplitude and recovery time (Tau) of the caffeine induced Ca^{2+} transients, under the conditions in **C** (n=28, N=4). Statistics: One-way Anova followed by Tukey's multi comparison test. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Fig. 3: $[Ca^{2+}]_o$ modulates $I_{Ca,L}$. **A:** I-V curve of $I_{Ca,L}$ obtained in WT SAN cells exposed to 1.8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ (n=11, N=2), 0.9 mmol/L (n=7, N=2) and 3 mmol/L (n=7, N=2). **B:** $I_{Ca,L}$ density measured at the peak of the I-V curve (0 mV) showed in **A**. **C and D:** examples (top) and histograms (bottom) of $I_{Ca,L}$ in $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SAN cells, measured under 1.8 mmol/L $[Ca^{2+}]_o$, 3 mmol/L and 3 mmol/L + nifedipine (3 μ mol/L), at the late diastolic or upstroke potentials (-35 mV or +10 mV; n=12, N=2). **E and F:** $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ components of $I_{Ca,L}$ obtained from **C** and **D** at -35 or +10 mV and expressed in % of the total $I_{Ca,L}$ recorded at each potential (**E**) or as real value of conductance (**F**). Statistics: One-way or Two-way Anova with Tukey's or Sidak's multi comparison tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Fig. 4: Different role of $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ in automaticity and contraction of SAN cells. **A:** Sample traces of spontaneous cell shortening obtained from WT, $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN cells, under 3 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ and subsequent superfusion of BayK (1 μ mol/L). Colored scale bars for cell shortening are equal to 1 μ m. Note the increase in the amplitude of cell shortening after BayK stimulation in WT and $Ca_v1.3^{-/-}$, but not in $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ SAN cells. **B, C, and D:** Beat rate, coefficient of variability and amplitude of cell shortening in SAN cells from WT (n=29, N=5), $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ (n=20, N=5) and $Ca_v1.3^{-/-}$ (n=24, N=4) mice, exposed to the conditions in **A**. # indicates significance of $Ca_v1.3^{-/-}$ versus WT (black) and $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ (green), under 3 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ + BayK (1 μ mol/L). Statistics: Two-way Anova with Sidak's multi comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Fig. 5: Effect of $[Ca^{2+}]_o$ on the automaticity and cell shortening of $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN cells. **A:** Traces illustrating spontaneous cell shortening recorded in $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN cells, under 1.8, 0.9 and 3 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$. Colored scale bars for cell shortening are equal to 1 μ m.

Fig. 6: Hypercalcemia induces arrhythmias in SAN tissues. **A:** Sample traces of optical APs recorded in the SAN leading region, under 1.8, 0.45 or 8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$. Note the delayed after

depolarization (DAD) indicated by a red arrow. **B**: Examples of intact SAN/Atrial preparation showing the shift of the leading pacemaker regions under the conditions in **A** (N=15). Colored dots indicate pacemaker leading regions of different tissue samples. Dotted lines connect different leading regions observed in the same SAN tissue. Shadowed colorations in black, green and red indicate the distribution area of the leading regions for each $[Ca^{2+}]_o$ condition in **A**. **C**: Examples of isochronal maps of voltage, showing the pacemaker leading region (bright red) and the conduction towards right and left atria (RA and LA, respectively) in green and blue. Each isochronal curve represents an interval of 4 ms. **D, E and F**: Rate, coefficient of variability of the AP interval and % of block of conduction in SAN tissues exposed to the condition in **A** (N=15). Statistics: One-way Anova with Tukey's multi comparison test. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

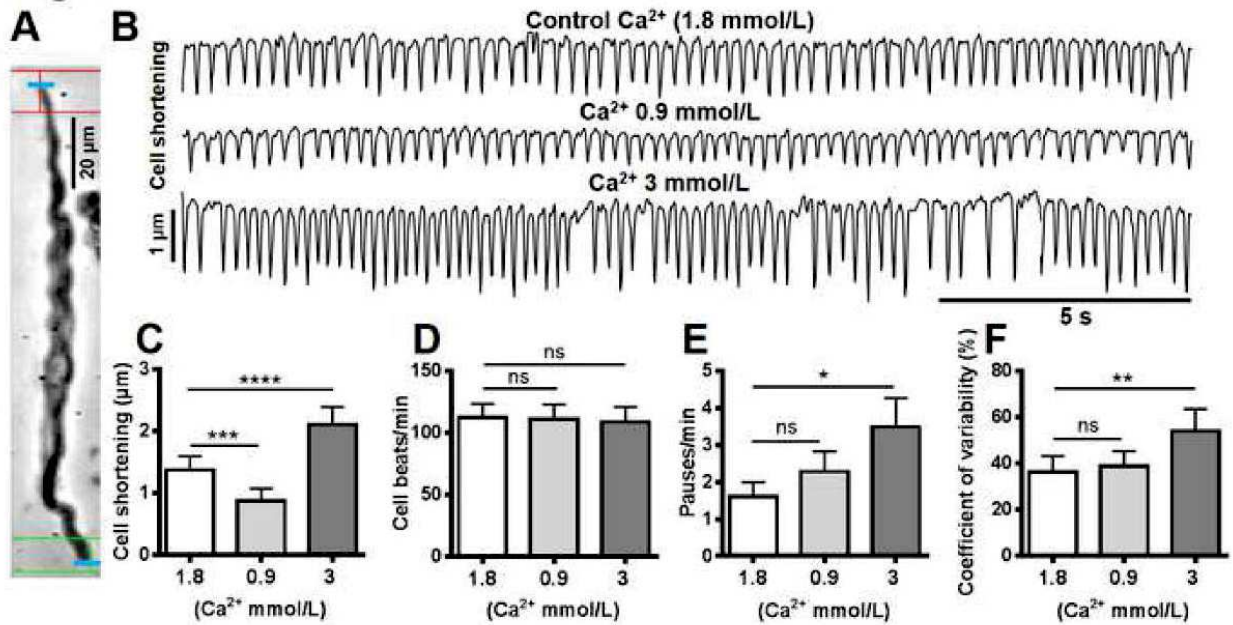
Fig. 7: Recovery of SAN automaticity after SK inhibition. **A**: Traces of optical APs, recorded in the pacemaker leading region of WT SAN tissues, exposed to 1.8, 8 and 8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ plus Apamin (100 nmol/L). Note the presence of a delayed after depolarization (DAD; red arrow). **B**: Example of SAN/atrial preparation showing the delocalization and relocalization of the pacemaker leading regions under the conditions in **A** (N=15). Colored dots, dotted lines and shadowed colorations are explained in the legend of Fig. 6. **C, D, and E**: Spontaneous rate, coefficient of variability and % of block of conduction toward the atria, under the condition in **A** (N=15). **F**: Time of conduction between the SAN leading region and the right or left atria (RA and LA, respectively), under the conditions in **A** (N=15). Statistics: Two-way Anova with Sidak's multi comparison test and paired t-test. * $p < 0.05$.

Table 1.

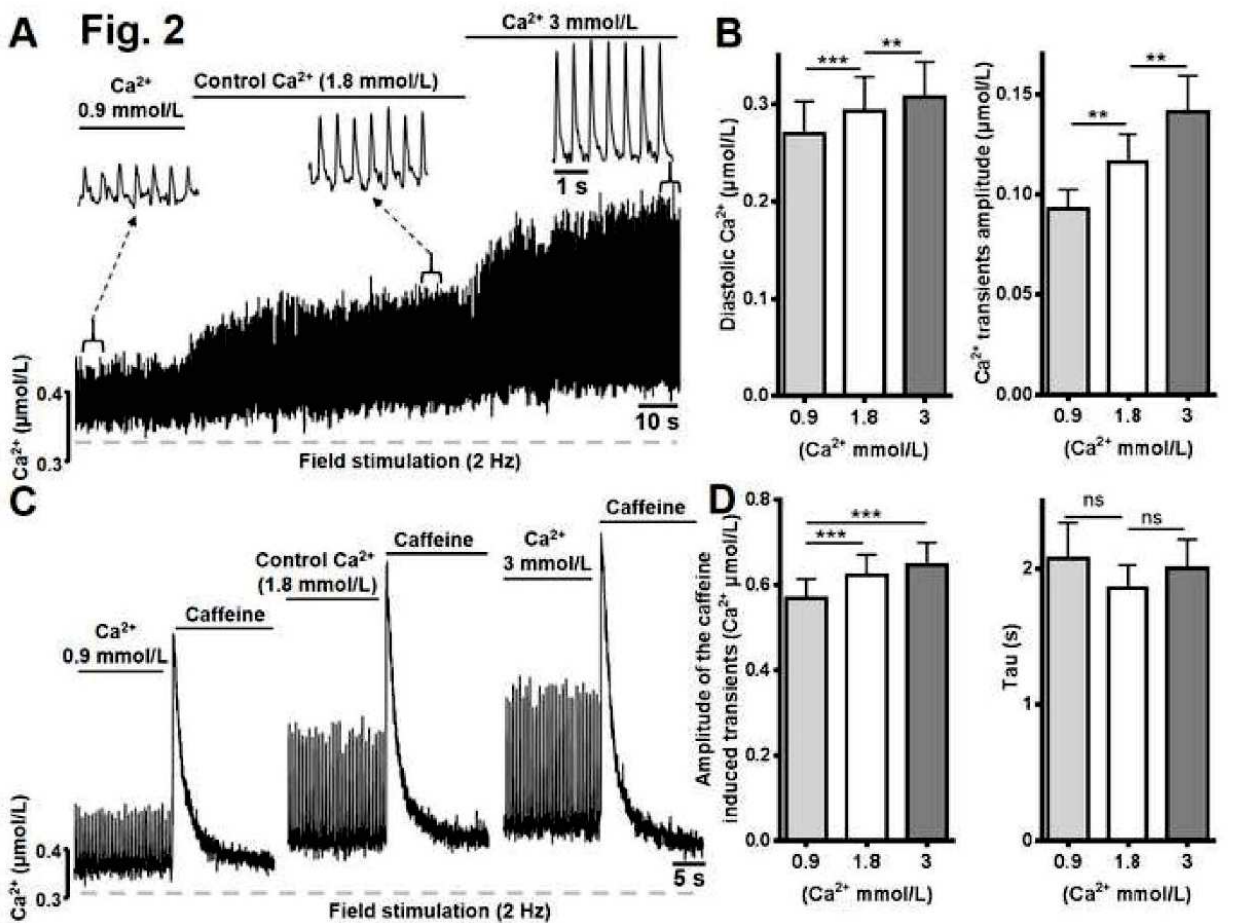
$[Ca^{2+}]_o$ (mmol/L)	Cell beats/min			Cell beats variability (Coefficient of variability, %)			Amplitude of cell shortening (μm)		
	1.8	0.9	3	1.8	0.9	3	1.8	0.9	3
WT	113±11	111±12	109±12	36±7	39±6	54±10	1.4±0.2	0.9±0.2	2.1±0.3
		—	—		—	▲**		▼***	▲****
Ca_v1.2^{DHP-/-}	137±14	127±12	140±15	33±9	32±6	56±12	1.0±0.3	0.5±0.1	1.4±0.3
	—	—	—	—	—	▲*	—	▲▲*	▲**
Ca_v1.3^{-/-}	71±10	86±11	51±9	46±6	40±5	46±6	1.1±0.2	0.5±0.1	1.7±0.3
	▼*	▲**	▼▼**	—	—	—	—	▼▼▼****	▲*

Table 1: Effect of $[Ca^{2+}]_o$ on the automaticity and cell shortening of Ca_v1.2^{DHP-/-} and Ca_v1.3^{-/-} SAN cells. WT (n=53, N=8), Ca_v1.2^{DHP-/-} (n=27, N=6) and Ca_v1.3^{-/-} (n=27, N=5). ▲ = increase; ▼ = decrease; — = no change. Statistical significance have been calculated between the three genotypes under control $[Ca^{2+}]_o$ (black color code), or in each genotype under the three $[Ca^{2+}]_o$ (green or red colors code). Statistics: One-way Anova with Tukey's multi comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

Fig. 1



A Fig. 2



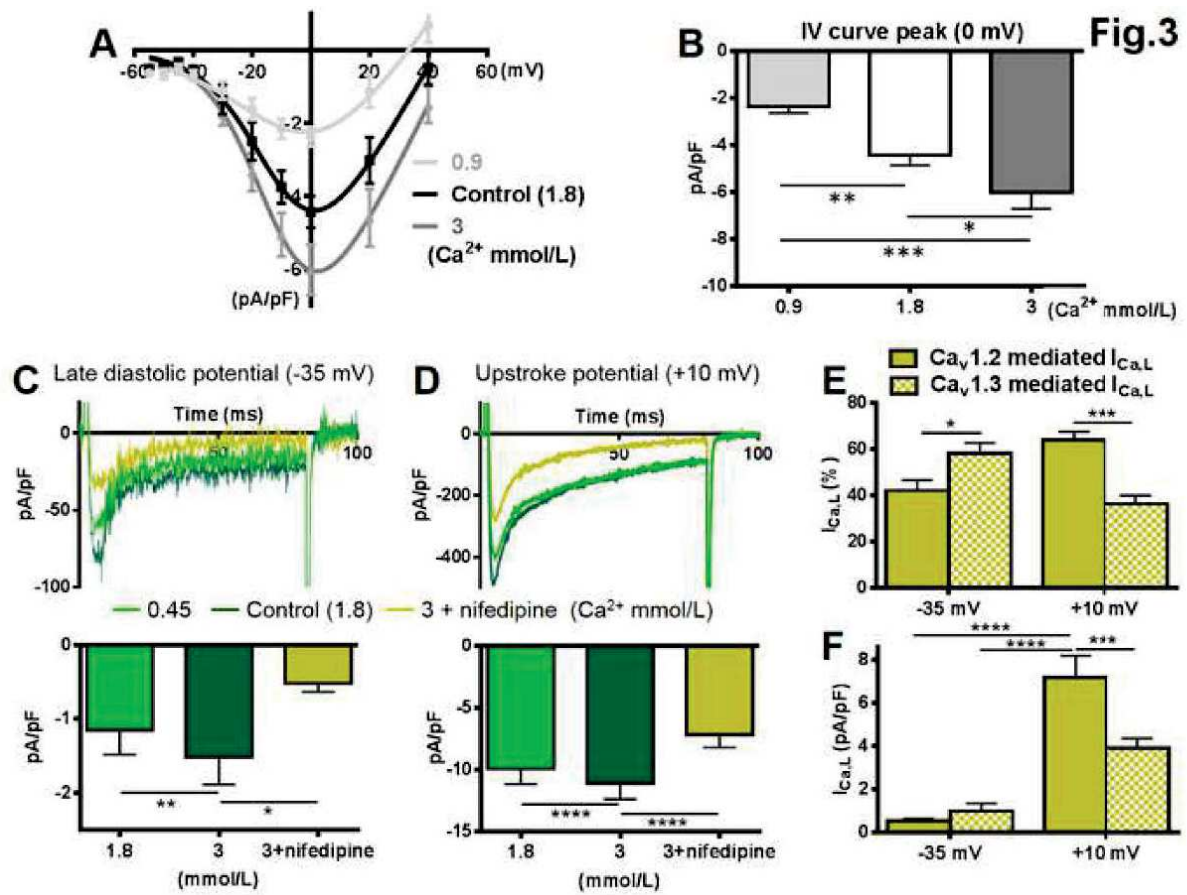


Fig. 4

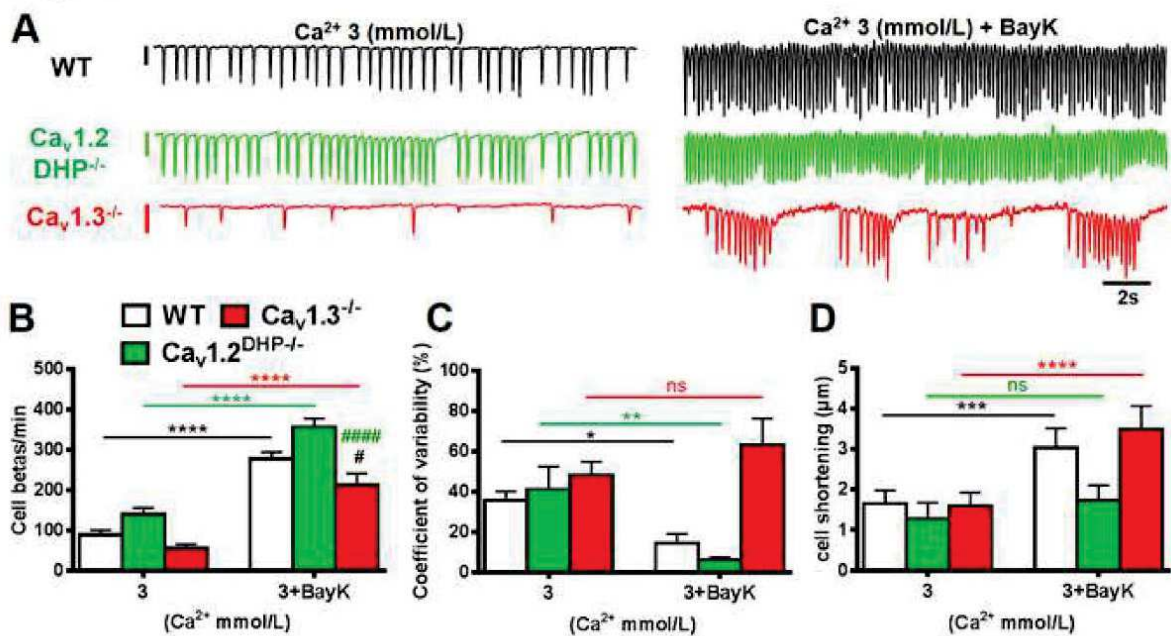


Fig. 5

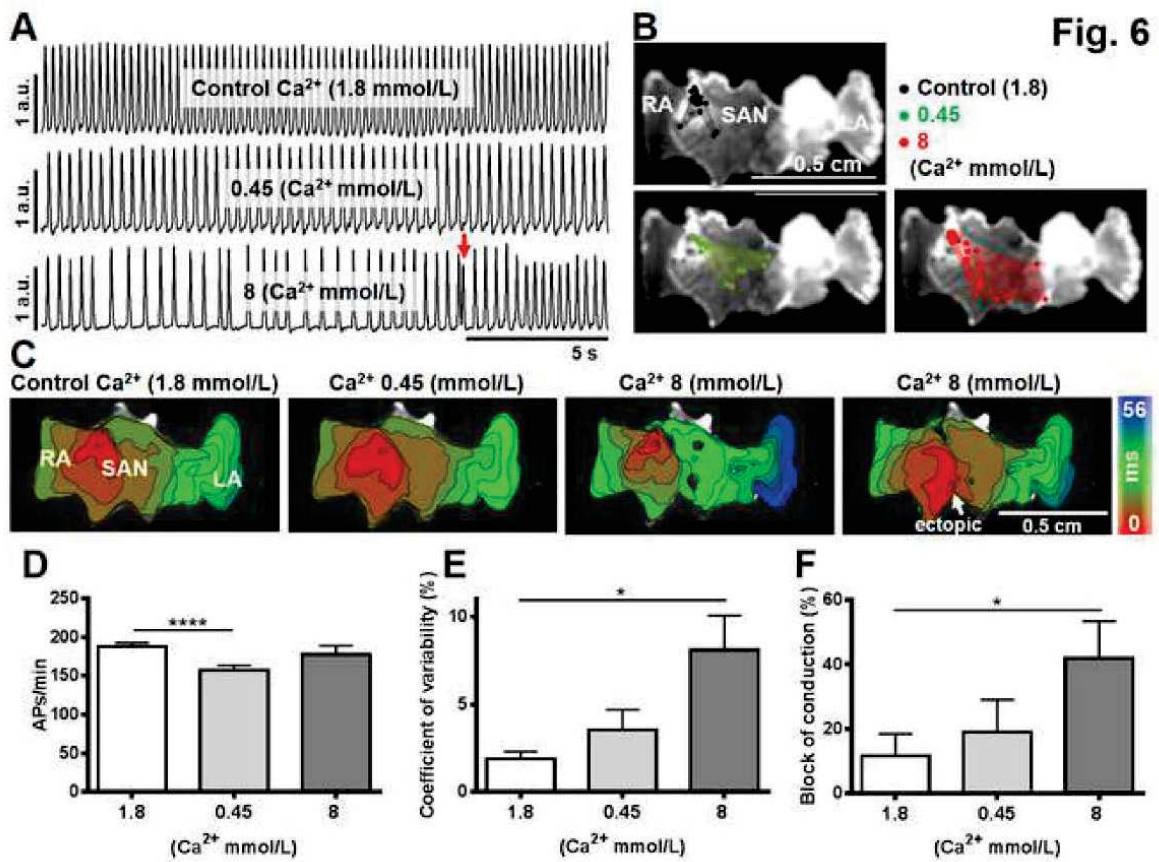
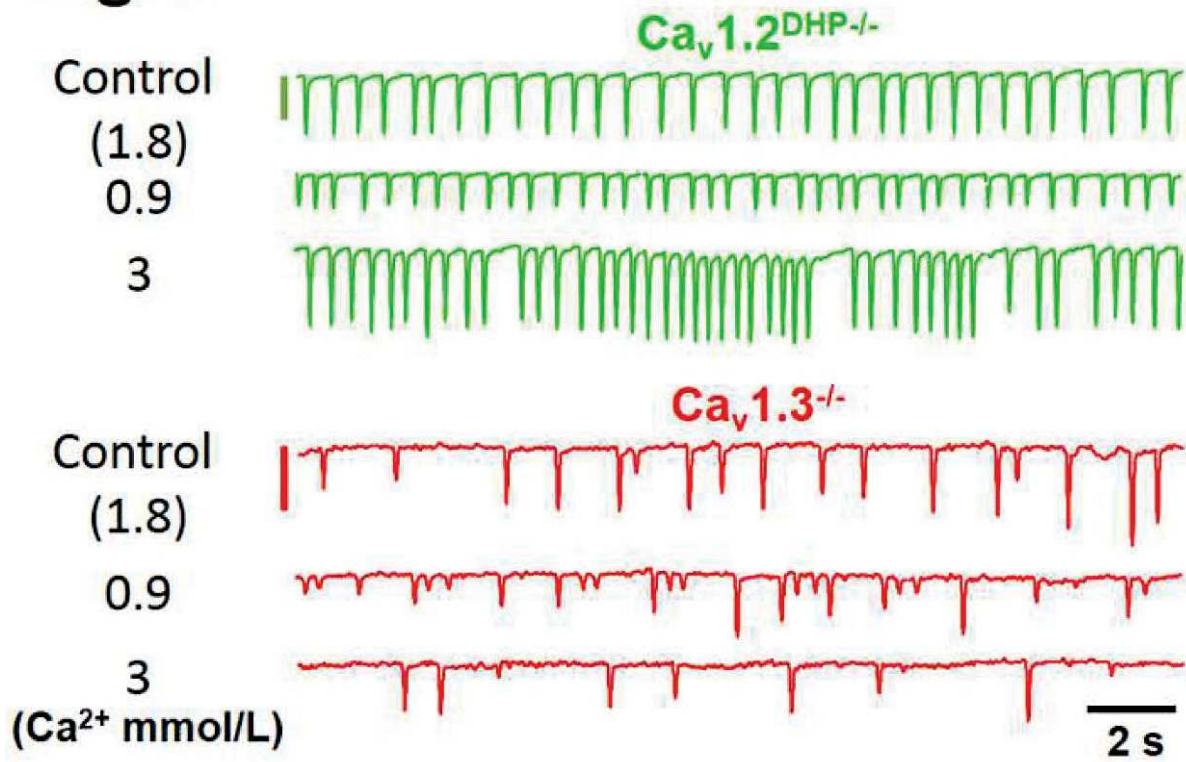
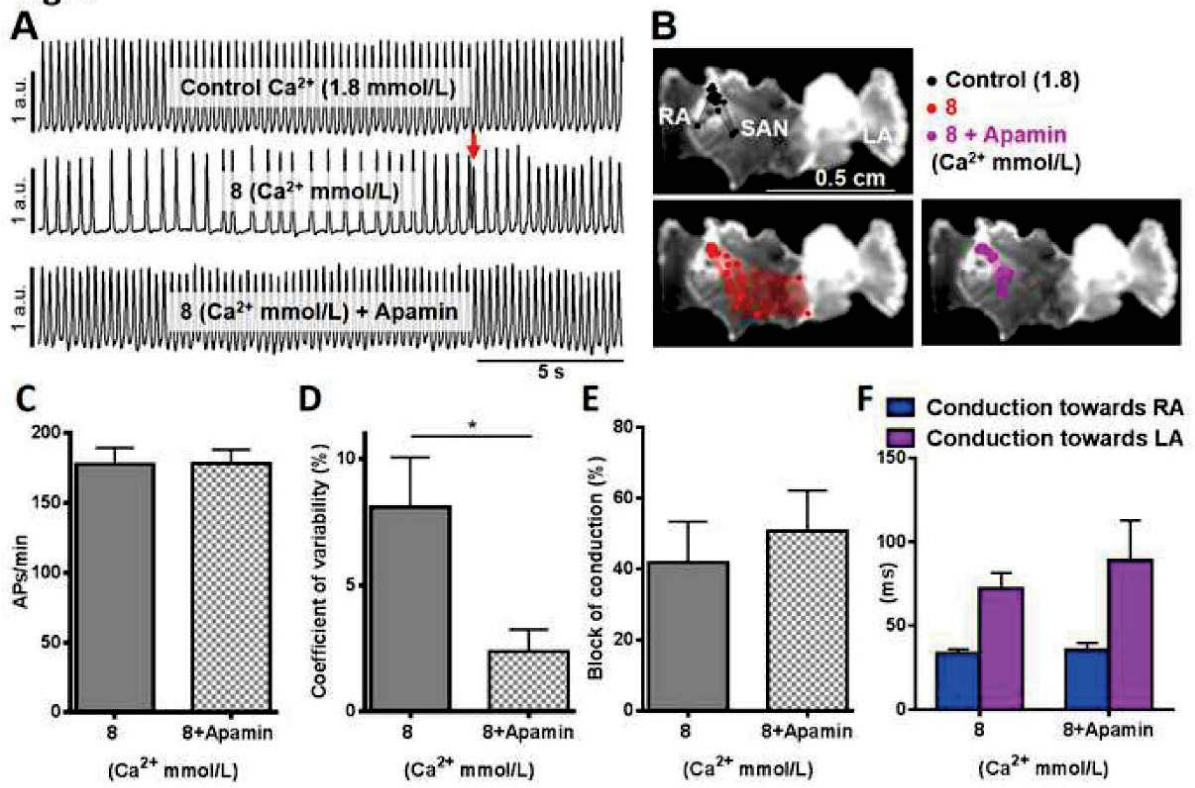


Fig. 7



1. Supplementary Materials and Methods

The generation of mice knockout (KO) for $(Ca_v1.3^{-/-})$ or carrying dihydropyridine -insensitive $Ca_v1.2$ channels ($Ca_v1.2^{DHP^{-/-}}$) have been previously reported^{1, 2}. The littermates of $Ca_v1.3^{-/-}$ that lack the mutated gene ($Ca_v1.3^{+/+}$) were used as wild type (WT) mice. Mice 3 to 5 months old, with an equal sex ratio, have been used to perform our experiments. This investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US national Institute of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and European directives (2010/63/EU). These protocols were approved by the Ethical committee of the University of Montpellier and the French Ministry of agriculture (N°: 2017010310594939). Animals were housed under standard conditions and allowed to access to food and water ad libitum.

1.1 Intact SAN/Atrial Preparation

SAN/atrial preparations (including SAN, right and left atria) were obtained as described previously³. Briefly, we removed the heart from mice under general anesthesia, consisting of 0.01 mg/g of Xylazine (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen Germany), 0.1 mg/g of Ketamine (Imalgène, Merial, Bourgelat France) and 0.2 mg/g of Na-Pentobarbital (CEVA, France). Then, we cut the coronary sinus and starting from it, we removed the ventricles from the heart. We used a stereomicroscope (SZX16, Olympus; Tokyo, Japan) with low magnification (7X) to trans-illuminate and visualize directly the remaining SAN/atrial preparation. We identified the SAN region using the borders of the superior and inferior vena cava, the crista terminalis and the interatrial septum as landmarks⁴. The SAN/atrial preparation was pinned to the bottom of an optical chamber (Fluorodish, FD35PDL-100, WPI; Sarasota, FL) coated with ~2 mm of clear Sylgard (Sylgard 184 Silicone elastomer kit; Dow Corning; Midland, MI). To avoid interference from secondary pacemaker tissues we removed the atrio-ventricular node from the preparation.

1.2 Isolation of mouse SAN cells

SAN myocytes were obtained as described previously⁵. The SAN was excised along the crista terminalis and the interatrial septum in pre-warmed (36°C) Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; Hepes-NaOH, 5; and D-glucose, 5.5; (adjusted to pH=7.4 with NaOH). The SAN tissue was then transferred into a “low- Ca^{2+} -low- Mg^{2+} ” solution containing (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; $MgCl_2$, 0.5; $CaCl_2$, 0.2; KH_2PO_4 , 1.2; taurine, 50; D-glucose, 5.5; bovine serum albumin (BSA), 1 mg/ml; Hepes-NaOH, 5; (adjusted to pH=6.9 with NaOH). We digested SAN tissue by adding a highly purified form of collagenase (Liberase TM; 229 U/mL; Roche, Indianapolis, IN) and elastase (1.9 U/ml, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). We immersed the SAN tissue in this cocktail of enzymes for about 15 minutes at 36 °C. The SAN tissue was then washed, and transferred into a modified “Kraftbrühe” (KB) medium⁶ containing (in mmol/L): L-glutamic acid, 70; KCl, 20; KOH, 80; (\pm)D-b-OH-butyric acid, 10; KH_2PO_4 , 10; taurine, 10; BSA, 1mg/ml; and Hepes-KOH, 10; (adjusted to pH=7.4 with KOH). We isolated single SAN myocytes by manual agitation in KB solution at 35 °C for 2-5 minutes. We slowly recovered cellular automaticity by re-adapting SAN myocytes to a physiological Ca^{2+} concentration of 1.8 in the extracellular solution. To this end, we added a solution containing (in mmol/L): NaCl, 10, $CaCl_2$, 1.8, and normal Tyrode solution containing BSA (1mg/ml). All chemicals were from Sigma (St Quentin, Fallavier), except for the (\pm)D-b-OH-butyric acid that was from Fluka Chemika (Buchs, CH). Solution with 0.9, 3, 4.8 and 8 mmol/L of Ca^{2+} were obtained by modifying the concentration of $CaCl_2$ in the Tyrode solution.

1.3 Measurements of cell shortening and $[Ca^{2+}]_i$ in single SAN cells

We harvested SAN cells in a Fluorodish (FD35PDL-100, WPI; Sarasota, FL), coated overnight with laminin (1mg/ml; Sigma-Aldrich). Cells were let to set on the glass bottom for 1 h. We then superfused SAN cells continuously with Tyrode solutions, warmed at 34-36°C through a

temperature-control system (SHM-8, Warner Instruments; Hamden, CT) in a warming chamber (QE-1, Warner Instruments). The amplitude of cell shortening was measured by a video-based motion detector (IonOptix; Milton, MA), using a fluorescent system interphase combined with the inverted microscope IX71 (Olympus; Tokyo, Japan). To quantify the concentration of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), single SAN cells were loaded with 0.5-1 $\mu\text{mol/L}$ of Fura-2 AM (Molecular Probe, Waltham, MA) for 30 to 40 min in the dark and at room temperature. Then the cells were washed with fresh Tyrode and left in this solution for about 15 min before starting the fluorescence recording. The ratio of the Fura-2 fluorescent emissions at 510 nm, was obtained after exciting the dye at 340 and 380 nm, by using a dual excitation fluorescence photomultiplier (IonOptix, Milton, MA). To convert fluorescence ratios into $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements, we employed the Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit F6774 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A standard calibration curve was obtained according to the manufacturer's instructions. Then we subtracted cell auto-fluorescence from the measurements of Fura-2 ratio in our cellular samples, and we fitted these values on the calibration curve to obtain the corresponding Ca^{2+} concentration ($\mu\text{mol/L}$). Fura-2 fluorescence was recorded through a Fluor X40 oil objective (Olympus, Tokyo, Japan). When required, cells were field stimulated at 2Hz with bipolar supra-threshold pulse voltages (20-40 V) of 1 ms in duration, by employing two platinum electrodes connected to a MyoPacer Field Stimulator (IonOptix, Milton, MA). Cell shortening and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes were analyzed using the Ionwizard 6.1 software (IonOptix, Milton, MA) and pClamp software (ver. 10.2, Axon Instruments Inc.).

1.4 Electrophysiological recording of $I_{\text{Ca,L}}$ in SAN cells.

To record $I_{\text{Ca,L}}$, the basal extracellular solution contained (in mmol/L): 135 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10 HEPES, 10 4-Aminopyridine, 1 MgCl_2 , 1mg/L D-glucose (adjusted to pH = 7.4 with TEA OH). 30 μM tetrodotoxin (TTX, Latoxan, Portes les Valence, France) was added to the external standard solution (Tyrode) to block I_{Na} . Patch-clamp electrodes had a resistance between 3.0 and 4.0 $\text{M}\Omega$ when filled with the Cs^+ -rich intracellular solution containing (in mmol/L): 125 CsOH, 20 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 1.2 CaCl_2 , 5 Mg-ATP, 0.1 Li_2 -GTP, 5.0 EGTA and 10.0 HEPES (pH adjusted to 7.2 with aspartate). All electrophysiological data were recorded through an AXON multiclamp 700B and analyzed using pCLAMP 10.2 (Molecular Devices, St Gregoire, France). All experiments were carried out at 36 °C.

1.5 Voltage mapping of the intact SAN/atrial preparation

To analyze voltage changes in the SAN/atrial tissue, the entire preparation described above was loaded by immersing the tissue in a Tyrode solution containing the voltage-sensitive indicator Di-4-ANEPPS (2 $\mu\text{mol/L}$). This immersion was done at room temperature (20-22°C) and last for at least 30 min. To maintain proper oxygenation, the chamber containing the tissue was maintained under agitation for the whole loading period. After the loading step, the tissue was washed in dye-free Tyrode for 15 min. During this step the temperature was slowly increased to 34-36° C. The SAN/atrial tissue was then constantly superfused at 34-36° C and imaged by high speed optical voltage mapping (1, 2 or 3 ms per frame) on a MiCAM Ultima-L CMOS Camera - 100x100 pixel CMOS sensor, 10x10 mm (SciMedia; Costa Mesa, CA). This camera was mounted on a THT Microscope, with two objectives (2X and 1.6X) that generated a field of view of 12.5 x 12.5 mm. A system constituted by a 150 W halogen light and a built-in shutter (SciMedia; Costa Mesa, CA) was used as the excitation source of light for the voltage dye. The filter set included a 531/50 nm excitation filter, 580 nm dichroic mirror, and 580 long-pass emission filter. To avoid motion artifacts, we blocked mechanical activity using blebbistatin (10 μM ; Tocris Bioscience; Bristol, UK)⁷. Optical raw data were analyzed using dedicated software from the camera developer, BVAna Analysis (Brainvision; Tokyo, Japan), in combination with pClamp (ver. 10.2, Axon Instruments Inc.).

Supplementary legends:

Supplementary Fig. 1: Correspondence between Ca^{2+} transients and contractions of SAN cells. **A:** Sample traces of Ca^{2+} transients (upper traces) and cell shortening (lower traces) simultaneously recorded, under different $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Black ticks indicate electric-field stimulation at 2 Hz.

Supplementary Fig. 2: Distinct roles of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ in Ca^{2+} influx. **A:** Sample traces of Ca^{2+} transients measured using Fura-2 probe in SAN cells paced at 2 Hz. Note the variation of amplitude of Ca^{2+} transients and basal (diastolic) Ca^{2+} in response to BayK (1 $\mu\text{mol/L}$) stimulation. **B and C:** Amplitude of Ca^{2+} transients and diastolic Ca^{2+} under 3 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in WT (n=17, N=3), $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ (n=27, N=4) and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (n=18, N=2) SAN cells. **D and E:** Variations of amplitude of Ca^{2+} transients and diastolic Ca^{2+} after BayK (1 $\mu\text{mol/L}$) stimulation in WT (n=13, N=3), $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ (n=21, N=4) and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (n=18, N=2) SAN cells. Statistics: One-way Anova with Tukey's multi comparison test. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

Supplementary Fig. 3: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics in $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ SAN cells.

A: Sample traces of Ca^{2+} transients in $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ SAN cell paced at 2 Hz. Note the variation of basal Ca^{2+} and amplitude of Ca^{2+} transients in response to change of $[\text{Ca}^{2+}]_o$. **B:** Diastolic Ca^{2+} and amplitude of Ca^{2+} transients, under control (1.8 mmol/L of Ca^{2+}) in WT (n=17, N=3), $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ (n=25, N=4) and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (n=18, N=2) SAN cell. **C and D:** Diastolic Ca^{2+} and amplitude of Ca^{2+} transients, under the conditions showed in **A**, in $\text{Ca}_v1.2^{\text{DHP-/-}}$ (n=13, N=2) and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (n=18, N=2) SAN cells. Statistics: One-way Anova with Tukey's or Holm-Sidak's multi comparison test. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Supplementary Fig. 4: Automaticity of the whole SAN tissue after mild alteration of $[\text{Ca}^{2+}]_o$.

A: Example traces of optical APs recorded under 1.8, 0.9 or 4.8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$. **B and C:** AP frequency and variability (Coefficient of variability) recorded under the conditions in **A** (N=8). Statistics: One-way Anova with Tukey's multi comparison test. Scales bars for the AP amplitude are equal to 1 arbitrary unit (a.u.) of fluorescence.

Supplementary Fig. 5: Hypercalcemia inhibits atrial conduction.

A: Example traces of optical APs, recorded in SAN tissues from WT, exposed to 1.8, 0.45 and 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Traces in black correspond to the spontaneous APs generated within the leading region of the SAN (see Fig. 7B and C). Traces in blue and purple correspond to the APs recorded on the edge of the right and left atria (RA and LA, respectively). Scale bars for AP amplitude are equal to 1 arbitrary unit (a.u.) of voltage fluorescence. Note the delayed after depolarizations (DADs) indicated by red arrows. **B:** Time of conduction between the SAN and the RA or LA, under the conditions in **A** (N=15). **C:** DADs/min generated under the conditions in **A** (N=15). Statistics: Two-way Anova with Tukey's multi comparison test. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

Supplementary Fig. 6: Long recording of APs generated by the SAN leading region.

Red arrows indicated arrhythmia only under 8 mmol/L of $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Scale bars for the AP amplitude are equal to 1 arbitrary unit (a.u.) of voltage fluorescence.

Supplementary Fig. 7: Hypercalcemia impairs sinus recovery time.

A: Example traces of optical APs, recorded in SAN tissues from WT, superfused with 1.8, 0.45 and 8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$ and stimulated at 16 Hz for 15 s. Note the long sinus recovery time (SNRT) after field stimulation of the SAN exposed to 8 mmol/L of $[Ca^{2+}]_o$. Scale bars for the AP amplitude are equal to 1 arbitrary unit (a.u.) of voltage fluorescence. **B:** SNRT under the conditions reported in **A** (N=10). Statistics: Paired t-test * $p < 0.05$.

Supplementary movie 1: Example of cell shortening recorded by edge detection in a SAN cell. Length units in the movie must be divided by 2.91 to be converted in μm .

Supplementary References:

1. Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, Renstrom E, Wietzorrek G, Berjukov S, Cavalli M, Walter D, Koschak A, Waldschutz R, Hering S, Bova S, Rorsman P, Pongs O, Singewald N, Striessnig JJ. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* 2004;**113**:1430-1439.
2. Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 2000;**102**:89-97.
3. Torrente AG, Zhang R, Zaini A, Giani JF, Kang J, Lamp ST, Philipson KD, Goldhaber JI. Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:9769-9774.
4. Neco P, Torrente AG, Mesirca P, Zorio E, Liu N, Priori SG, Napolitano C, Richard S, Benitah JP, Mangoni ME, Gómez AM. Paradoxical effect of increased diastolic Ca²⁺ release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2012;**126**:392-401.
5. Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:51-64.
6. Isenberg G, Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 1982;**395**:6-18.
7. Farman GP, Tachampa K, Mateja R, Cazorla O, Lacampagne A, de Tombe PP. Blebbistatin: use as inhibitor of muscle contraction. *Pflugers Arch* 2008;**455**:995-1005.

Fig. S1

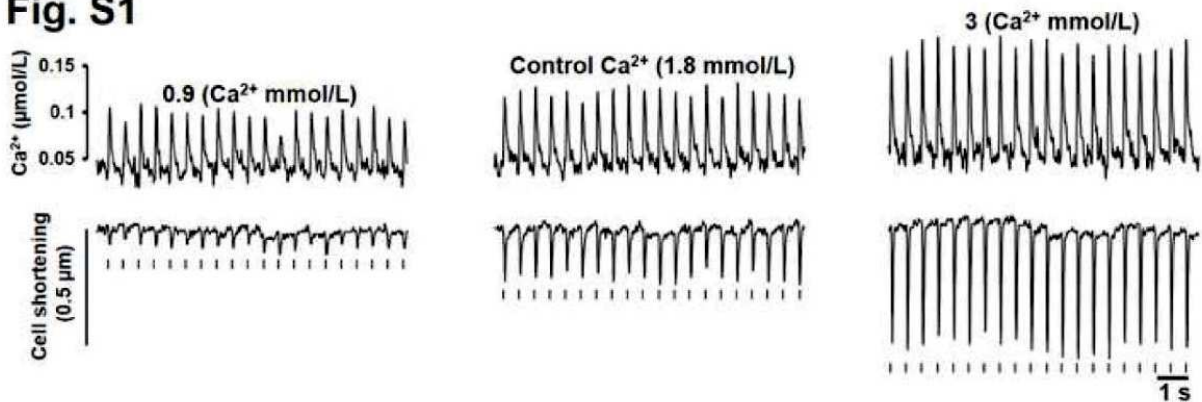
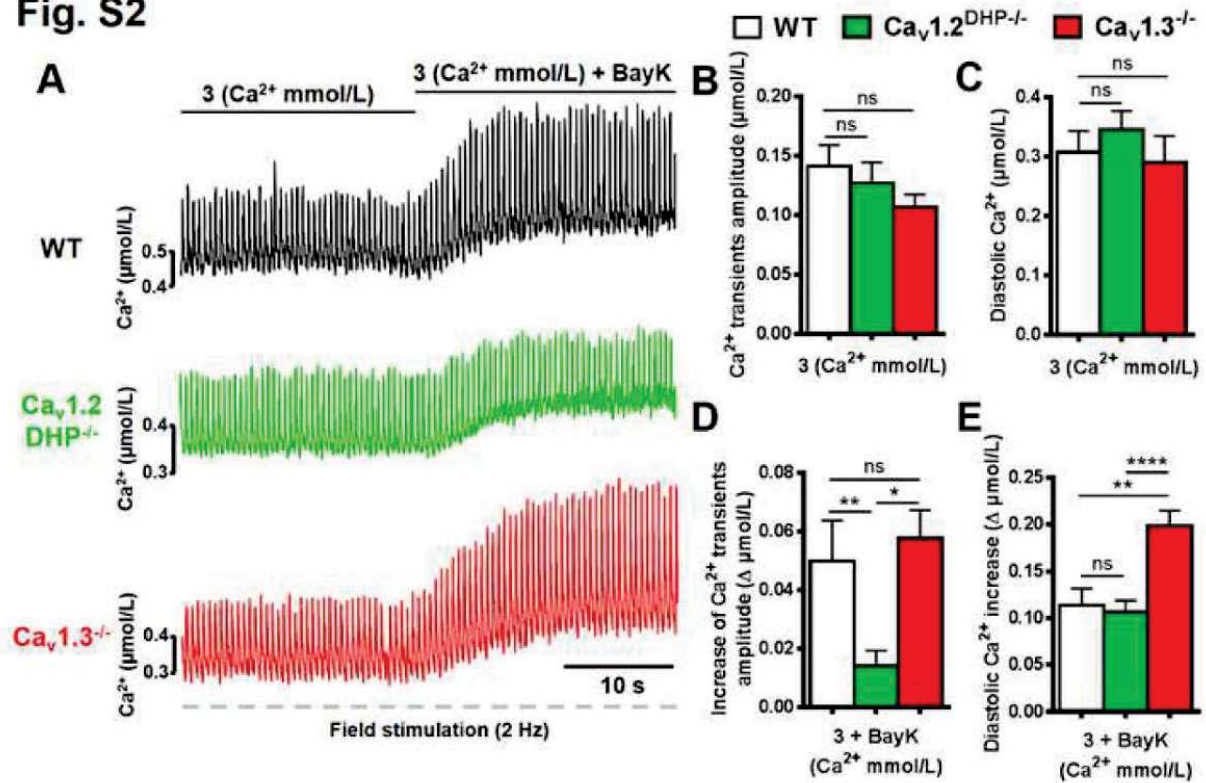
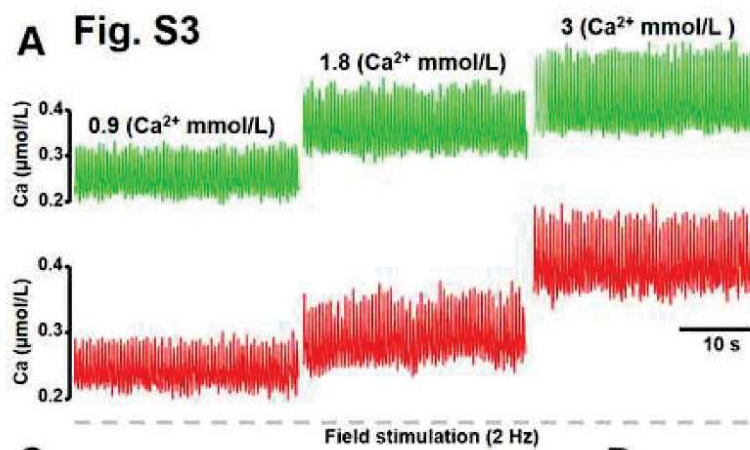


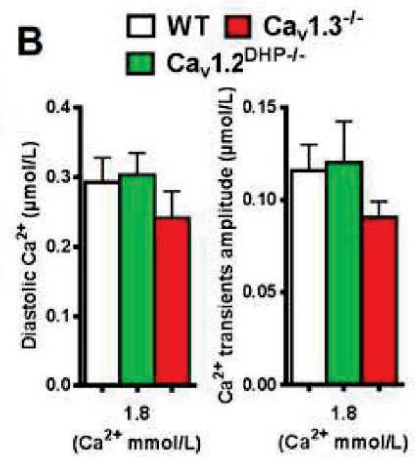
Fig. S2



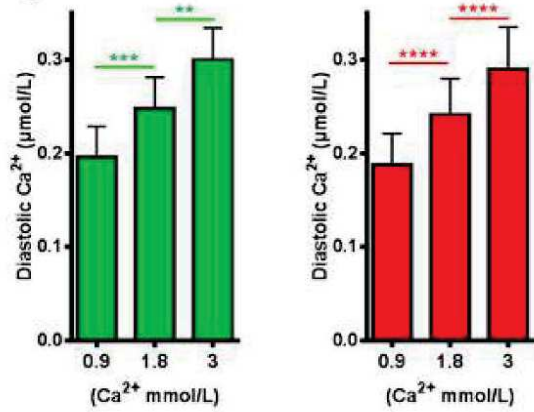
A Fig. S3



B



C



D

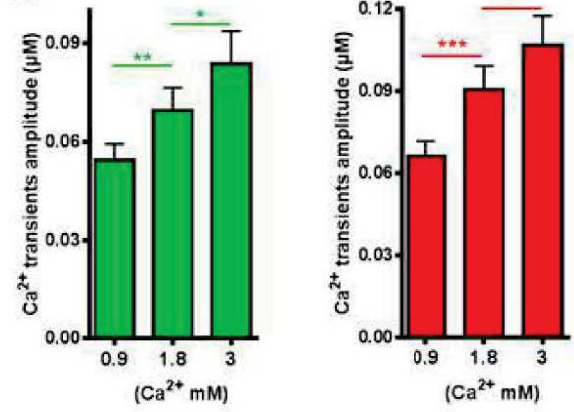


Fig. S4

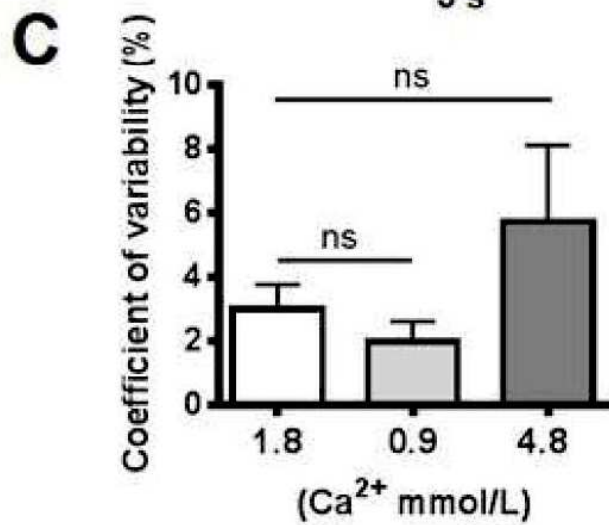
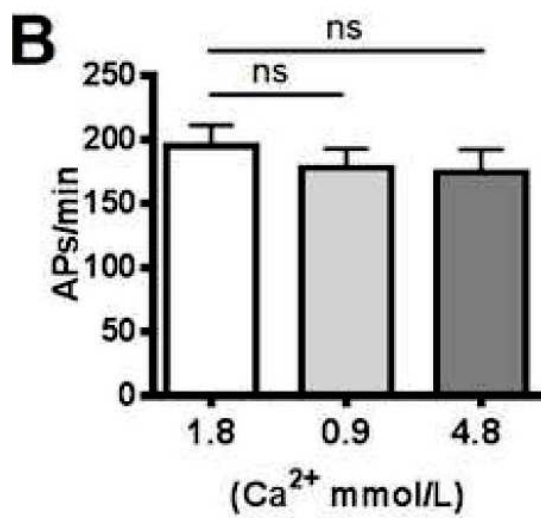
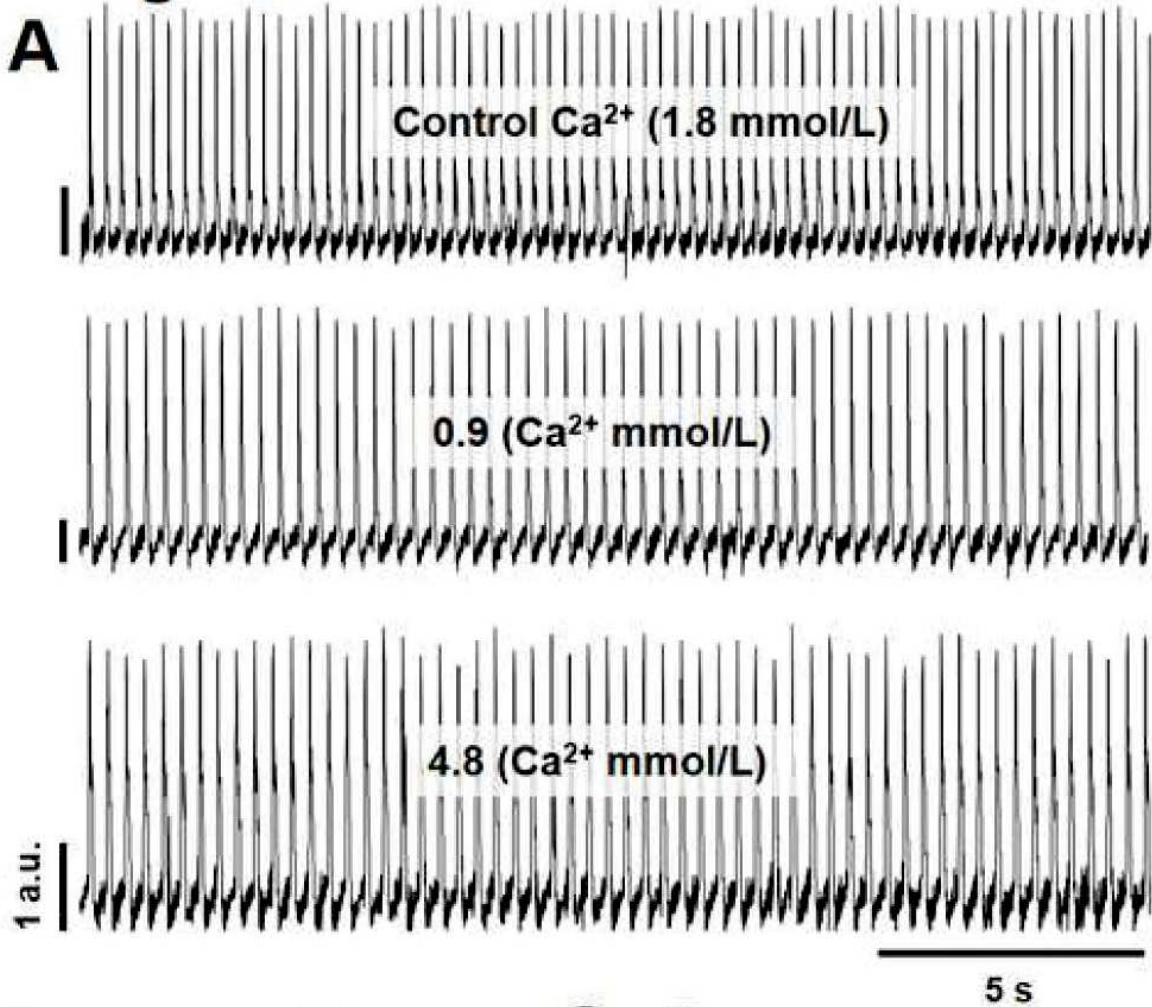


Fig. S5

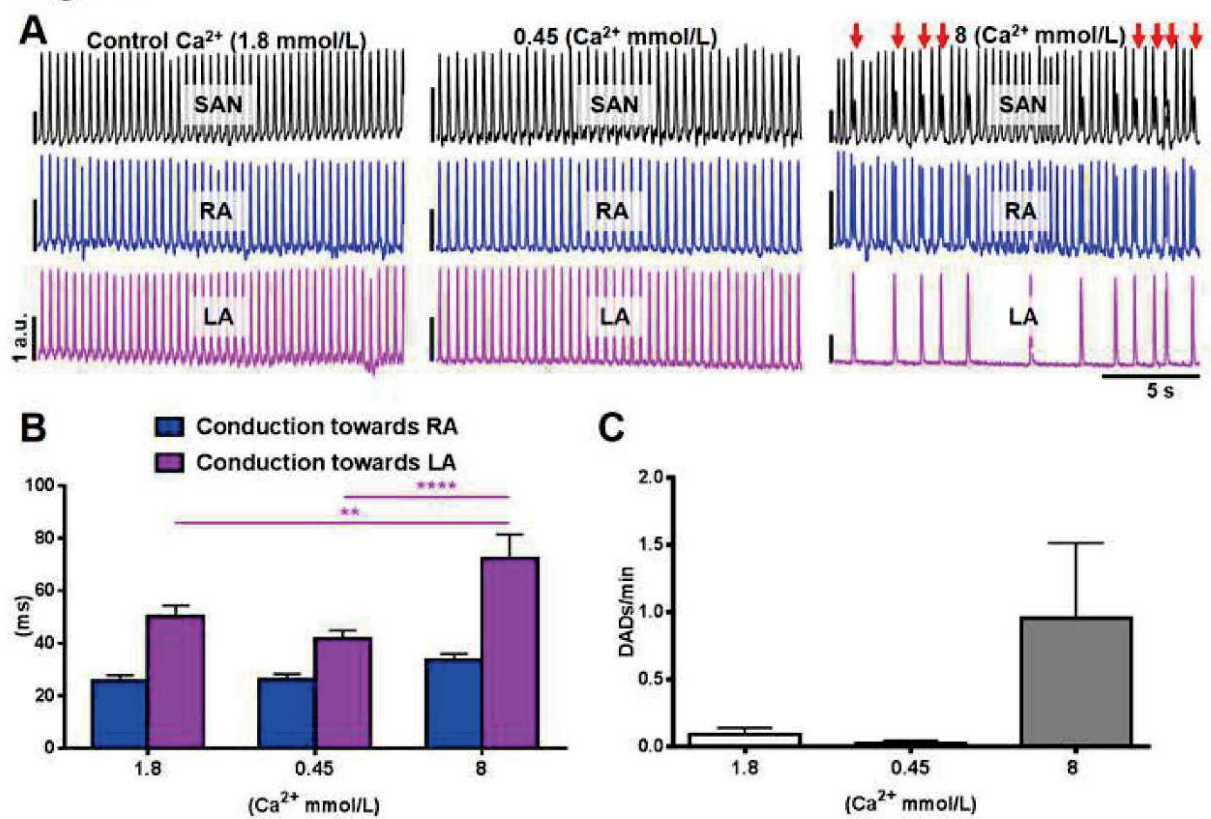
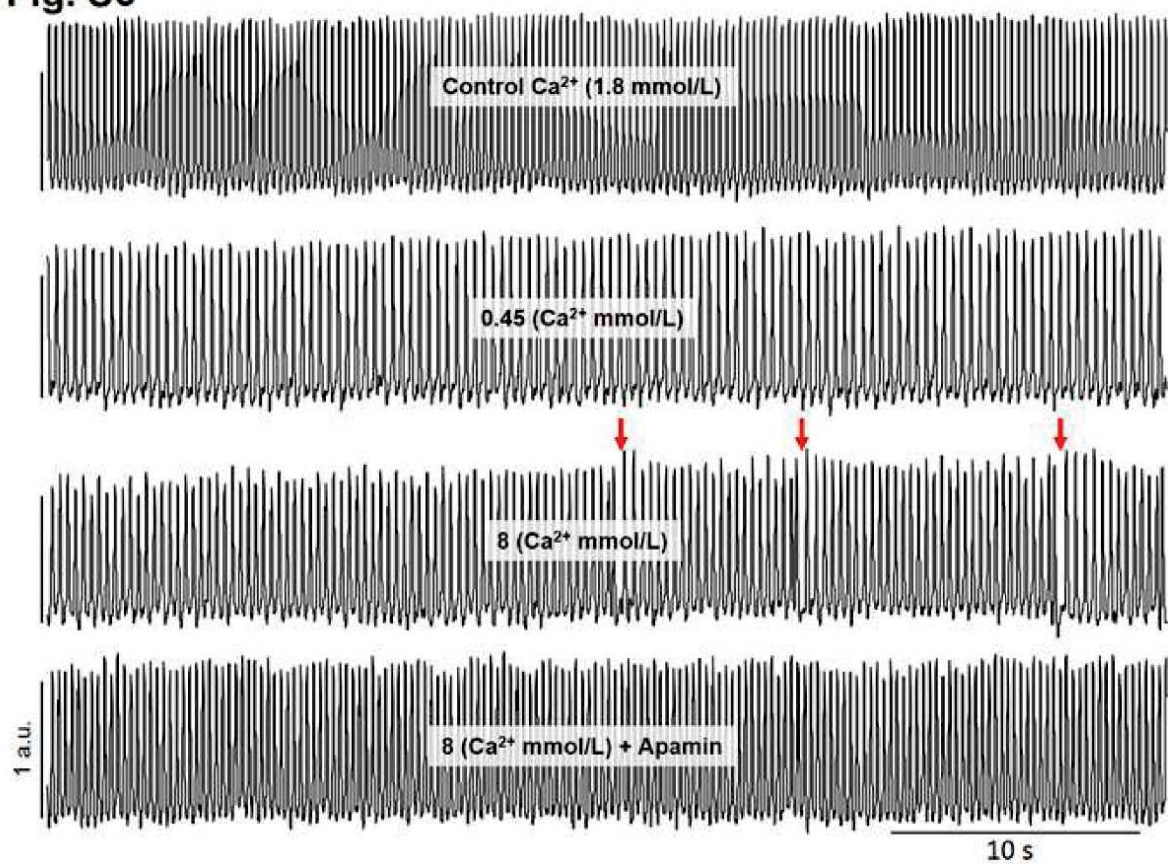


Fig. S6





Click here to access/download
Supplementary Material - Video, Audio
Suppl movie 1.avi



P. Mesirca et collaborateurs, Nature Communication, 2018.

A venir également, la collaboration avec l'équipe "Biologie des cellules de mammifères" dirigée par Anne Fernandez et Ned Lamb nous a permis de mener une étude avec des cellules souches d'origine musculaire (MDSC: muscle-derived stem cell (Arsic, Mamaeva et al. 2008)) dérivées en cellule *pacemaker* avec un grand potentiel dans une thérapie cellulaire contre la bradycardie. La propriété intéressante des MDSC qui fait leur intérêt potentiel en thérapie régénératrice, est qu'elles ne sont pas tératogènes et peuvent donc être utilisées *in vivo* directement, sans besoin de prédifférenciation, ce qui n'est pas le cas pour les ESCs ou iPSCs. Cette propriété et la caractéristique de non-adhérence des MDSC leur confèrent une meilleure capacité à migrer *in vivo* après l'injection par voie systémique.

Une première version de la publication a été examinée dans Nature communication et sa publication est sous réserve de vérifications complémentaires, notamment en cartographie optique du NSA isolé. Ma participation dans cette étude va consister à analyser en cartographie optique l'activité *pacemaker* des NSA isolés de souris ayant reçues 40 jours auparavant une injection de MDSC différenciées.

Bradycardic mice undergo effective heart rate improvement after specific homing to the sino-atrial node and differentiation of adult muscle derived stem cells.

Pietro Mesirca^{1,2*}, Daria Mamaeva^{3,8*}, Isabelle Bidaud^{1,2}, Romain Davaze^{3,4}, Mattia L. DiFrancesco¹⁻³, Violeta Mitutsova^{3,4}, Angelo G. Torrente^{1,2}, Nikola Arsic^{3,7}, Joël Nargeot^{1,2}, Jörg Striessnig⁵, Amy Lee⁶, Ned J. Lamb³, Matteo E. Mangoni^{1,2@} and Anne Fernandez^{3@}

¹Institut de Génomique Fonctionnelle, Département de Physiologie, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, 141 rue de la Cardonille, Montpellier, F-34094, France

²LabEx Ion Channels Science and Therapeutics (ICST).

³Cell Biology group, Institut de Génétique Humaine, CNRS and Université de Montpellier, 141 rue de la Cardonille, Montpellier, F-34396, France.

⁴Université de Montpellier, UM, Montpellier, F-34094, France.

⁵Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Pharmacy, Center for Molecular Biosciences, University of Innsbruck, Austria.

⁶Department of Molecular Physiology and Biophysics, University of Iowa, IA, USA.

⁷present address: Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier, CNRS, UMR5237, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

⁸present address: Institute for Neurosciences of Montpellier, INSERM U1051, 80 avenue Augustin Fliche, Montpellier, F-34091, France.

* These authors contributed equally to this work

@ authors for correspondence

Abstract

Current treatment for heart automaticity disorders still lack a safe and efficient source of stem cells to bring about biological pacemaking. Since adult Muscle-Derived Stem Cells (MDSC) show multi-lineage differentiation *in vitro* including into spontaneously beating cardiomyocytes, we questioned whether MDSCs could effectively differentiate into cardiac pacemakers, a specific population of myocytes producing electrical impulses in the sino-atrial node of adult heart. We show here that beating cardiomyocytes, differentiated from MDSC *in vitro*, exhibit typical characteristics of cardiac pacemakers: the expression of Hcn4, Tbx3 and Islet1, as well as spontaneous calcium transients and hyperpolarization-activated “funny” current, a unique signature of sino-atrial pacemakers. Pacemaker-like myocytes differentiated *in vitro* from Ca_v1.3-deficient mouse MDSC produced slower Ca²⁺ transients, consistent with the reduction of native pacemaker activity in these mice. In vivo, systemic injection of undifferentiated wild type MDSCs into bradycardic mutant Ca_v1.3^{-/-} mice was ensued by their migration and homing to the sino-atrial node area within 48h and differentiation into Ca_v1.3-expressing pacemaker-like myocytes within 10 days, a process accompanied by a significant improvement of the heart rate after 10 days that was maintained for up to 5 weeks. These findings identify MDSCs as directly transplantable stem cells that efficiently engraft, differentiate and improve heart rhythm in a mouse model of congenital bradycardia.

Introduction

Stem cells with the capacity to self-renew and differentiate into several lineages can be isolated from most adult tissues and organs. However, as the largest vascularised and innervated organ in the body, and one with the life-long ability to undergo atrophy and regeneration, skeletal muscle is particularly rich in multipotent stem cells (reviewed by Peault et al., ¹ and by Tamaki et al. ^{2,3}). Various populations of stem cells were isolated from muscle, the best studied being satellite cells. Named from their tight association to muscle fibres, satellite cells account for muscle fibre regeneration and are an heterogeneous population (reviewed by Yin et al. ⁴). In addition skeletal muscle contains connective tissue-, vascularisation-, and innervation-derived progenitor and stem cells, which cooperate with satellite cells in tissue repair (reviewed by Peault et al. ¹, Tamaki et al. ³ and Ten Broek et al. ⁵). Consistent with the neuro-muscular identity of skeletal muscle, differentiation of muscle-derived stem cells into different meso-ectodermal cell lineages was reported in several studies including from human muscle ⁶⁻⁸ and after clonal growth of muscle stem cells ⁹.

We previously reported that a population of muscle-derived stem cells (MDSCs) ¹⁰ isolated from adult mouse muscle on the basis of their low adherence by sequential preplating ^{11,12} is multipotent ¹⁰. In particular this population spontaneously differentiated into autonomously beating cardiomyocyte-like cells ¹⁰. This autonomous phenotype questioned whether beating cardiomyocytes derived from MDSC may be identical to pacemaker myocytes, a small population of highly specialized cells in the right atrium of adult hearts located in the Sino-Atrial (SAN) and Atrio-Ventricular Node (AVN)¹³. Pacemaker cells are endowed with automatic electrical activity, and this enables them to generate the cardiac impulse that is conducted through the atrial tissue and the AVN, to the Purkinje fibre network from which it depolarizes the ventricular myocardium¹³. In vertebrates, automaticity is one of the first features of cardiogenesis, with all cardiac cells of the early embryo capable of autonomous beating. During late development of the chambers and conduction system, the SAN emerges from a morphologically distinct area that develops within the sinus venosus, at the site where the right atrium enters the intercaval region, due to up-regulation of the Tbx18 and Tbx3 transcription factors and their repression of cardiogenic Nkx2.5^{14,15}. The generation and conduction of the pacemaker impulse within the SAN differs from that in working atrial myocytes in that membrane depolarisation is spontaneous and intercellular electrical resistance is high ^{16,17}. To fulfil this requirement, pacemaker myocytes uniquely express a particular set of ion channels: the hyperpolarisation-activated cAMP-gated cation channel 4, HCN4; voltage-gated Ca_v1.3 channels; and a specific subset of connexins, including connexin45 (Cx45) and Cx30.2 (but not the high-conductance gap junction proteins Cx40 and Cx43 which are typically expressed

in working cardiomyocytes)^{18,19}. Pacemaker myocytes thus represent a specialized cardiac myocyte type that is essential for proper heart function and whose properties and defining markers are distinct from those of working cardiomyocytes.

In humans, SAN dysfunction (SND) results in reduced life expectancy and necessitates the implantation of >450,000 pacemakers/year in Europe and the U.S., a number predicted to double over the next half century²⁰. Whereas pacemaker implantation remains the primary therapy for SAN dysfunction and bradycardia-associated arrhythmias²¹, this approach is costly, requiring lifelong management including regular technical inspections. These limitations and complexity in the use of an electronic device are even greater in pediatric and young patients²². Considering the global impact of SAN dysfunction, it is generally agreed that new therapeutic strategies are needed. The development of a cell-therapy approach to repair the damaged SAN and restore pacemaker activity is paramount to achieving stable, life-long improved heart function and to restoring patient quality of life²². Toward this goal it will be necessary to identify suitable sources of transplantable stem cells that are capable of differentiating, *in vivo*, into functional pacemaker myocytes.

In the current study, we tested the ability of MDSCs to differentiate, both *in vitro* and *in vivo* in mutant mice, into pacemaker myocytes. We report that MDSC can migrate and home to the SAN where they differentiate into pacemaker-like cardiomyocytes, and that this homing and differentiation of MDSCs ameliorates heart rhythm in congenitally bradycardic mutant mice.

Results

***In vitro* analysis: MDSCs spontaneously differentiate into autonomously beating cardiomyocytes with the characteristics of pacemaker cells.**

MDSCs were isolated from mouse hind-limb muscle via sequential replating of non-adherent cells, as shown in Fig. 1a and described previously¹⁰. Non-adherent stem cells were replated in fresh proliferation medium every 24 hours to avoid their premature differentiation and to stimulate their proliferation. The rationale for daily replating and centrifugation is two-fold: the replating prevents loss of the less adherent stem cells, which would otherwise attach to counterparts that adhere and proliferate more rapidly (e.g., fibroblasts, myofibroblasts and pre-adipocytes); and the centrifugation depletes the cultures of muscle fibre-derived microsomes and other muscle-specific non-cellular components that may contribute to the myogenic commitment of muscle stem cells. A comparative analysis of the transcriptomes of muscle cells extracted 24 hours after activation of proliferation (corresponding to PP1) and MDSCs isolated after 7 days of pre-plating (corresponding to PP8) revealed a 12-fold increase in cyclinA2 expression (Fig.1b), indicating a high level of cell proliferation. The same analysis revealed a 10-fold increase in the expression of Islet-1, a LIM-homeodomain transcription factor expressed in heart and pancreatic progenitor/stem cells, and a

>30-fold increase in expression of Peg3/PW1, which is expressed in stem cells isolated from muscle and several adult tissues²³. Of note, the stemness factor Nestin, whose expression is high even in PP1 cells, was increased >2-fold in PP8 MDSCs (Fig. 1b). These data confirm that 7 days of preplating non-adherent cells from mouse skeletal muscle is an effective means of isolating a proliferating stem cell population.

We previously reported that non-adherent MDSCs in PP8 cultures provided with an attachment matrix such as laminin, fibronectin, or a fibroblast layer (but not collagen) became adherent and underwent multi-lineage differentiation¹⁰. Amongst the different phenotypes observed, cells with the ability to beat autonomously were observed within 3 to 5 days and these cells exhibited persistent contractile activity for over 2 months in culture (Fig.1c and Supplementary video 1). Single beating cells or clusters of cells with coordinated beating rhythms were observed (Supplementary videos 2 and 3), and the morphology of these beating myocytes was reminiscent of that of native SAN pacemaker cells (Supplementary Fig. 1). Henceforth, we refer to these *in vitro* differentiated, spontaneously beating cells as MDSC-derived pacemaker-like cells (MDSC-PMs). To investigate whether these cells exhibit properties of SAN cardiomyocytes, we first analyzed a number of molecular markers of pacemaker development and activity. SAN development is initiated in a small area of the septum venosus that co-expresses Tbx18 and Islet1 transcription factors, after which expression of the Shox2 and Tbx3 transcription factors is initiated and that of Nkx2.5 is down-regulated^{14,24,25}. RT-PCR analysis of non-differentiated MDSCs (Fig. 2a, Supplementary Table 1) revealed that Tbx18, Islet1, Shox2 and Tbx3 were expressed, whereas Nkx2.5 was not. Notably, Shox2 is a core component of the myogenic program resulting in development of the venous pole and pacemaker²⁵, and also of the pacemaker program in embryoid bodies²⁶. Pacemaker-like differentiated MDSC-PMs likewise expressed Tbx18, Tbx3 and Islet1 no longer expressed Shox2 and showed little or no expression of Nkx2.5. This specific expression pattern is consistent with the identification of beating myocytes differentiated *in vitro* from MDSCs as mature cardiac pacemaker myocytes and not fetal-derived immature cardiomyocytes. Indeed, pacemaker cells in the adult heart differ from atrial and ventricular cardiomyocytes in that they do not express Nkx2.5, which acts as a repressor of the pacemaker gene expression program^{14,25}. In addition, pacemaker myocytes are unique in retaining Islet1 expression in adult heart²⁷.

A hallmark of cardiac pacemaker cells is their expression of the channel HCN4²⁸, which is responsible for generating the "funny" current (I_f)²⁹. RT-PCR analysis of pacemaker-like MDSC-PMs (Fig. 2b, Table S1) showed that they express the pore-forming subunits of HCN4 and $Ca_v1.3$ channels, both of which are required for normal cardiac pacemaker activity in mice³⁰⁻³⁴ and humans^{35,36}. MDSC-PMs also express the pacemaker-specific gap junction protein Cx45^{14,37} and the cardiac contractile proteins α -actinin and Troponin I (Fig. 2b). The co-expression of these

proteins in beating pacemaker-like cells was tested by double-immunofluorescence of cultured, differentiated MDSCs, with cells undergoing sustained beating filmed before fixation. Fig. 2c shows immunostaining of MDSC-PMs for HCN4 and Cav1.3. Given that HCN proteins, Cav1.3, and Cx45 are also markers of neural cells, co-staining for cytoskeletal markers of striated muscle cells (cardiac Troponin I or sarcomeric α -actinin) was necessary to confirm the cardiac phenotype (Fig.2c). Of note, in the panels showing co-staining for α -actinin and Cx45, a typical neural cell on the right expressed Cx45 but not α -actinin. Fig. 2d displays cells co-stained for Cav1.3 and Islet1 (nuclei indicated by arrows including a phase-contrast field showing that both markers are expressed in beating cells (see Supplementary video 4).

Importantly, *in vitro* differentiation of muscle-derived stem cells into MDSC-PMs was not a peculiarity of mouse muscle stem cells. It was also observed in muscle stem cells isolated from adult Sprague Dawley rat muscle (Supplementary Fig. 2 and Supplementary video 5), and both the kinetics and co-expression of pacemaker markers (shown in Fig.S2 are HCN4 and α -Actinin) were similar to that in mice.

We next tested MDSC-PMs for the functional properties of native sino-atrial pacemaker using current-clamp recordings (Fig. 3). Readings from isolated beating pacemaker-like myocytes revealed spontaneous repetitive action potentials at rates comparable to those produced by native SAN pacemaker myocytes (170 bpm in pacemaker-like myocytes, Fig. 3a, versus 190 bpm in native SAN myocytes³³). Consistent with HCN4-positive staining (Fig.2), MDSC-PM myocytes displayed the I_f current (Fig. 3b), which is involved in the pacemaker activity of native SAN myocytes^{29,38}. We then recorded the spontaneous contraction frequency of beating cells by using a cell edge detection device (see methods). The selective I_f inhibitor ivabradine (IVA)³⁹ reduced the frequency of spontaneous cell contraction by more than 75%, demonstrating that the I_f is a key determinant of the spontaneous activity of pacemaker-like myocytes (Fig. 3c).

Whether contracting myocytes generate spontaneous intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) transients similar to those produced by native mouse sino-atrial pacemaker myocytes was tested by loading MDSC-PMs with Fluo-4-AM. Line-scan images (Fig. 3d) revealed spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients with upstroke and recovery phases similar in form and timing to those of native mouse pacemaker myocytes^{34,40,41}. Line-scan images were recorded before and after the cultures were perfused with epinephrine or acetylcholine, to determine whether the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients was regulated in opposite directions by the activation of β -adrenergic³⁴ and muscarinic⁴² receptors. Indeed, epinephrine (2 nM, Fig. 3d) accelerated, whereas acetylcholine (50 nM, Fig. 3d) reduced, the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients. Ryanodine receptors (RyRs) are also involved in sino-atrial pacemaker activity (reviewed in ref.⁴³) and perfusion of MDSC-PMs with ryanodine (3

μM , Fig. 3d) led to a near-complete arrest of spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients. Thus, RyRs appear to play a major role in the automaticity of MDSC-PMs, similar to that in native SAN pacemakers⁴³.

We previously showed that loss of $\text{Ca}_v1.3$ channels slows automaticity and leads to arrhythmia in native SAN myocytes^{30,34}. To test whether MDSC-PMs differentiated from $\text{Ca}_v1.3$ knockout ($\text{Ca}_v1.3^{-/-}$) mice reproduced the phenotype of native $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes, we compared their beating frequency to that of MDSC-PMs derived from wild-type MDSCs. As shown Fig. 3e, the rate of spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in MDSC-PMs differentiated from $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ MDSCs was significantly slower and their frequency less regular than those in MDSC-PMs from wild type MDSCs, consistent with findings from our previous work on native SAN myocytes from $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice^{34,42}.

Together, these data show that MDSCs are capable of differentiating, *in vitro*, into beating pacemaker-like myocytes with all the specific markers and electrophysiological properties of native cardiac pacemaker cells. Furthermore, *in vitro* differentiation of MDSCs derived from the muscle of bradycardic SND $\text{Ca}_v1.3^+$ mutant reproduced the slower beating phenotype of bradycardic SND $\text{Ca}_v1.3^+$ mutant hearts. These results also demonstrate that $\text{Ca}_v1.3$ channels play a key role in the pacemaker activity of MDSC-PMs, consistent with *in vivo* data from $\text{Ca}_v1.3^+$ mice^{42,44,45} and from humans carrying congenital loss-of-function of $\text{Ca}_v1.3$ channels³⁶.

***In vivo* analysis: MDSCs injected into mice lacking $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v3.1$ channels migrate and home to the SAN where they differentiate resulting in improved heart rate**

To test the ability of MDSCs to differentiate *in vivo* into pacemaker cells and their potential therapeutic effects, we employed the $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ deficient mouse, a well-characterized model of human SAN dysfunction^{36,42}, as recipients in stem cell transplantation experiments. Both embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSC) can be differentiated into SAN-like cardiomyocytes *in vitro* and have been shown to provide promising short-term “biological” pacemaker activity in the ventricle⁴⁶⁻⁴⁹. However, the high proliferation rate and associated tumorigenicity of these cell types preclude their direct use as stem cells for *in vivo* cell therapy in the absence of previous differentiation. In contrast, we found no evidence for a long-term teratogenic or tumorigenic potential of MDSCs (Supplementary Fig. 3a). Whereas mouse ESCs grafted subcutaneously onto 8-week-old immunodeficient SCID mice (n=2) induced tumour outgrowth at the site of the graft, requiring euthanasia after 3 weeks, no tumours formed in mice (n=4) engrafted with MDSCs, and the animals remained tumour-free for over 4 months after either sub-cutaneous (Supplementary Fig. 3a) or intraperitoneal transplantation (data not shown, n=6). In addition, RT-PCR analysis (n=4) revealed that MDSCs express 3 of 4 pluripotency transcription factors (Sox2, Nanog, Lin28) but not the major one, Pou5F1/Oct4 (Supplementary Fig. 3b) a result

confirmed by RNAseq analysis on triplicate MDSC samples. The lack of teratoma formation after MDSC injection supports the direct use of these stem cells *in vivo*, without the need for prior differentiation.

At 24 and 72 hours after I.V. injection, DiI membrane-labelled MDSCs were found to be similarly distributed to major filtration organs (e.g., liver and kidney) and lymph organs (spleen and lymph nodes) in wild-type and mutant recipient mice (Davaze, Mitutsova et al. manuscript in preparation). Similar analyses of I.P.-injected, labelled-MDSCs showed enhanced MDSC homing to organs with targeted injury, such as streptozotocin-damaged pancreatic islets⁵⁰. Thus, MDSCs used directly as stem cells *in vivo* without prior differentiation have the ability to migrate and home to a variety of organs. This property was exploited to test the capacity of MDSCs to migrate to the SAN tissue, differentiate *in vivo*, and restore compromised heart automaticity in our mouse models with SAN-dysfunction, as represented in Fig.4a. MDSCs labelled with the membrane-binding cell tracker DiI-CM were transplanted, by I.V. or I.P. injection, into $Ca_v1.3^{-/-}$ mutant mice with severe defects in SAN impulse generation and atrioventricular conduction as well as into age-matched wild-type counterparts. At 48 hours after injection, a significant number of labelled stem cells were found implanted in the SAN tissue of recipient $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (Fig.4c), whereas only few were present in the SAN of wild-type mice (Fig.4b); this finding was reproduced in 4 wild-type and 4 $Ca_v1.3^{-/-}$ mutant mice using the same MDSC preparation. These results show that in the $Ca_v1.3^{-/-}$ mutant mouse, effective migration of stem cells into the bloodstream after I.P. injection occurred and engraftment to the SAN tissue was enhanced compared to that in wild type SAN tissue. Such increased homing of MDSCs in mutant SAN tissue may be related to the SDF-1–CXCR4 chemotactic axis, a major pathway in the regulation of stem-cell migration and homing^{51,52}. Indeed, comparison of the expression of SDF1 and CXCR4 levels in SAN tissue isolated from the two groups of mice showed that SAN tissue from $Ca_v1.3^{-/-}$ mice expressed higher levels of both SDF1 and CXCR4 than did SAN tissue from wild-type counterparts (RT-PCR analysis in Supplementary Fig. 4).

To determine whether SAN engraftment of injected wild type MDSC was followed by their differentiation into cardiac myocytes, we isolated intact SAN tissue from the hearts of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice 30 to 40 days after MDSC injection and performed whole-mount immunostaining for cells expressing the $Ca_v1.3$ pore-forming $\alpha 1$ subunit, which is absent from SAN tissue originating from the recipient mutant mouse^{44,53}. As shown Fig.5, the SAN of transplanted $Ca_v1.3^{-/-}$ mice was positive for $Ca_v1.3$ staining. Notably, arrays of cells (zoomed panels 5a and 5c with 49 and 54 $Ca_v1.3$ -expressing cells, respectively) showed membrane and striated patterns of staining for $Ca_v1.3$ similar to those for native mouse SAN pacemaker cells⁵³, including increased staining at junctions between cells with typical pacemaker morphology (arrow in Fig. 5b).

The effectiveness of the differentiation of MDSCs into Cav1.3-expressing myocytes and their long-term colonisation was further confirmed by clear detection of Cav1.3-stained cells in the SAN of Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} double-mutant mice 5 months after IV injection of wild-type MDSCs (Supplementary Fig. 5). Staining for Cav1.3 was specific because it was absent in the SAN of control mock-transplanted Cav1.3^{-/-} mice (n=5, Supplementary Fig. 6).

Whether colonization of the SAN by MDSCs and their differentiation in bradycardic mutant mice was accompanied by an improvement in heart rhythm was determined by analyzing heart rate during the resting (daylight) period. To this end, telemetric ECG recordings were made in freely moving Cav1.3^{-/-} mice, before and at different times after the injection of undifferentiated wild-type MDSCs (Fig. 6a). Consistent with a previous study⁴⁴, Cav1.3^{-/-} mice experienced SAN dysfunction and atrioventricular blocks before injection, (Fig. 6a and Table 1). However, by 40 days after systemic transplantation of muscle-derived stem cells, the MDSC-injected mice had a significantly higher (32%, Fig. 6b) heart rate than before the procedure (Fig. 6b and Table 1), indicating that the SAN pacemaker activity had improved. Heart rate elevation in Cav1.3^{-/-} mice was due to improvement of SAN rate (PP interval). No significant differences were observed in heart rate and the other ECG parameters in wild-type mice. Similarly, no significant changes in heart rate were observed following implantation of only a ECG transmitter (no MDSCs; Supplementary Fig. 7a) or when control wild-type mice were injected with MDSCs (Table 1). All control animals were kept under identical conditions as MDSC-injected Cav1.3^{-/-} mice. Measurement of QT, rate-corrected QT (QTc) and QRS ECG intervals showed that MDSC injection did not affect ventricular repolarization, and no episodes of ventricular arrhythmia or sudden death were observed in MDSC-injected Cav1.3^{-/-} and wild-type mice (Table 1). We then tested whether injection of MDSC could improve the heart rate in mice lacking both Cav1.3 and Cav3.1 channels (Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-})⁵⁴. This mouse model presents with strong SND hallmarks and highly variable SAN rate. If MDSC injection ameliorated the heart rate of Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} mice, this would have been reflected as an increase in SAN rate and in a reduction in the inter beat variability. Indeed, upon injection of wild-type MDSCs, the heart rates of Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} mice were clearly improved within 30 days (as measured during the active night-time period: +20%) (Fig. 6c-d, Table 2). Heart rate of double-mutant Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} and wild-type mice was also recorded under anesthesia 10 to 20 days after injection of MDSCs. This recording of sedated mice revealed a significant increase in heart rate in the double-mutant mice by 10 days (+28%, Supplementary Fig. 7b) and a decrease in the inter beat standard deviation after 20 days (Supplementary Fig. 7c), whereas similar injection of MDSCs into wild-type mice did not result in significant changes in either heart rate or inter beat standard deviation (Supplementary Fig. 7b-c). The number of SAN pauses or AV blocks after MDSC injection into either single Cav1.3^{-/-} or double Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} mutants did not change significantly (Table 1 and

2). Together these data show that systemic injection of wild-type MDSCs into bradycardic mutant mice resulted in a significant improvement in the heart rate of mutant mice whereas it did not affect the heart rate of wild-type mice.

Discussion

Our data reveal that skeletal muscle harbours a population of non-tumorigenic stem cells, MDSC, that can be directly transplanted by systemic injection and are capable of differentiating into functional pacemaker-like myocytes. Given the limitations of other sources that have been considered, MDSCs represent an attractive and easily available source of stem cells with a high potential for use in cell therapy for the treatment of disorders of human heart automaticity.

In the last decade, human myoblasts (derived from satellite cells) have been on early clinical trial as a source of stem cells for myocardial autologous cell therapy raising hope of bringing functional benefit (reviewed by Menasché⁵⁵). However, it is now clearly recognized that myoblasts do not differentiate into cardiomyocytes after injection into the heart, but instead may fuse into multinucleated myotubes. Such differentiation may cause conduction blocks eventually leading to ventricular arrhythmia. This disappointing outcome essentially put a brake on considering skeletal muscle as a source of stem cells in cardiac cell therapy. Although most of the regenerative capacity of skeletal muscle throughout life is accounted for by satellite cells, it has become clear that the muscle niche is remodelled in dynamic balance with other stem cells derived from peri-vascular and peri-neural muscle compartment that represent an alternative source of MDSCs^{2,9,10}.

Taking into account this alternative, our study opens a new avenue of research on the use of skeletal muscle as a source of stem cells in therapies for diseases of heart automaticity. Indeed, our data show that the systematic injection of undifferentiated MDSCs produced functional improvements in heart rhythm (and reduced arrhythmia) in recipient mutant mice, with the stem cells migrating and homing to the SAN region and differentiating into pacemaker-like cells expressing the Ca_v1.3 channel. Whereas alternative approaches towards effective biological pacing have been reported, with some using ion channel gene transfer in the ventricular conduction system^{22,56} and others *in situ* reprogramming of ventricular cardiomyocytes⁵⁷, the current study is the first to demonstrate direct repair of the SAN through the *in situ* differentiation of transplanted stem cells. Although transplantation of a similar population of MDSCs has been reported to improve recovery of the heart from ischemic injury, the effect in that case was attributed to the secretion of paracrine factors without significant retrieval or differentiation of donor stem cells⁵⁸. ESCs and iPSCs can differentiate into beating, pacemaker-like cells *in vitro*^{46,47}. These differentiated cells were recently shown to be able to engraft in the ventricle and support pacemaker activity^{48,49}. However, their transforming and teratoma-forming potential precludes their direct use for cell therapy and requires

prior cueing toward cardiac differentiation, with a potential loss of plasticity, migration and survival ability ^{46,59}. In contrast, MDSCs, which are non-tumorigenic, were directly transplanted into the bloodstream or peritoneal space of mutant recipient mice, where they not only homed to the SAN and differentiated into beating, pacemaker-like cells, but also reduced defects in heart automaticity that are associated with the knock-out of the $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channel ⁴⁴. Importantly, we also show here that MDSCs can differentiate *in vitro* into spontaneously active MDSC-FMs, displaying features of mature SAN pacemaker cells. This also make MDSCs a convenient source of stem cells to recapitulate defects in heart automaticity *ex vivo* and assay potential therapeutic drugs.

In SAN cells, heart automaticity is generated by an association between the activity of ion channels such as $Ca_v1.3$ ³⁰, HCN4 ³⁸ and that of RyR-dependent Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum ⁴³. Genetic ablation (from muscle-donor mouse) or pharmacologic inhibition of these channel activities in spontaneously active MDSC-PMs reproduced slowing of pacemaker activity, as reported in the current literature on native SAN-resident pacemaker cells. Our results thus indicate that the pacemaker mechanism underlying spontaneous activity of MDSC-PMs is similar to that of native SAN, and support the notion that MDSCs differentiated *in vitro* from mutant mice can reproduce and model heart-rhythm dysfunctions. This hypothesis is in line with the capability of MDSCs to improve the heart rate of mutant mice following their colonization of the SAN and differentiation at this site.

Although the mechanism underlying the spontaneous ability of MDSCs to migrate and home to the SAN tissue of mutant mice is not fully understood, it likely involves chemotaxis via the SDF1-CXCR4 pathway, as supported by data shown in Supplementary Fig. 4. Furthermore, in light of reports on heart regeneration by exercise-activated cardiac stem cells ⁶⁰, on the activation of muscle stem cells by exercise (review by Macaluso & Myburgh ⁶¹), and on the presence of stem cells from recipient patients in transplanted human hearts (i.e., “chimeric transplanted hearts”) ^{62,63}, it is tempting to speculate that some stem cells that have been classified as “resident cardiac” may have originated from exercise-activated circulating MDSCs. It is known that denervation, like exercise, results in long-lasting activation and proliferation of resident muscle stem cells but that 90% of these cells are subsequently lost from the muscle (and not fused to the denervated-re-innervated muscle) ⁶⁴. In this regard, it will be important to compare profiles of circulating stem cells retrieved after exercise or muscle denervation to those in the resting state.

We recently showed that the MDSCs studied here migrate and home to streptozotocin-damaged pancreatic islets 48 hours after I.P. injection and that within 10 days they differentiate into cells expressing insulin ⁵⁰. Further, we found that MDSCs are recruited to site(s) of injury, be it chemically induced ⁵⁰ or mechanically induced (such as glycerol injection in one of the two tibialis

muscles) (Davaze, Mitutsova et al., manuscript in preparation). Thus, the capability of MDSCs to migrate and home to damaged tissues could be exploited for therapeutic purposes.

SAN dysfunction is a multi-factorial disease that often begins with a moderate reduction in heart rate that is otherwise asymptomatic, and that this subsequently degenerates into bradycardia associated with invalidating symptoms and syncope⁶⁵. Early therapy of SAN dysfunction could potentially avoid or delay the need to implant an electronic pacemaker²⁰. In this regard, restoring damaged or degenerated SAN tissue by direct transplantation of MDSCs, in particular from the own muscle of the patient, constitutes an attractive possibility. We found that amelioration of heart rate in bradycardic mice occurs about 3 weeks following cell transplantation. This delay presumably reflects the time required for MDSCs to differentiate into MDSC-PMs. However, we recently also showed that the inhibition of G-protein gated K⁺ channels (I_{KAc3}) (by either genetic deletion or a pharmacologic agent) may rescue the SAN dysfunction and heart block normally observed in Ca_v1.3^{-/-} mice⁴². It is thus possible that future therapies for SAN dysfunction may combine a pharmacologic strategy such as I_{KAc3} inhibition to improve heart rate in the short term, followed by a long-term cell therapy-based approach employing MDSCs.

Materials and Methods

Mouse strains

Six to ten week-old wild-type C57Bl/6 mice or transgenic C57Bl/6 "green mice" expressing eGFP under beta-actin promoter⁶⁶ were used to prepare MDSC as donor mice for transplantation experiments. Recipient wild-type, Ca_v1.3^{-/-} and Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} mice used for transplantation experiments were all of C57Bl/6 genetic background⁵⁴. All procedures were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union, French laws and the Ethical committee of the University of Montpellier (N°: 2017010310594939).

Cell culture

MDSC were prepared using the preplate procedure originally described by Qu-Petersen et al.¹¹ as modified in Arsic et al.¹⁰

Briefly, mouse hind-limb muscles were removed, minced and enzymatically dissociated at 37°C for 45 min in 0.2% collagenase A (Roche) and 1 mg/ml dispase (GibcoBRL). After digestion, muscle cells were passed through 100 µm then 40 µm nylon cell strainers (BD Falcon) and centrifuged at 360 g for 10 min. Pelleted cells were washed twice in phosphate buffer saline (PBS), suspended in growth medium GM [DMEM/F12 (SIGMA, Les Ulis, France), 16% fetal bovine serum (PAA), 1% Ultrosor G (Pall Life Sciences, Washington, USA), 100µM Beta-mercapto-ethanol, antibiotic-antimycotic mix (Gibco, Invitrogen Inc. Saint Quentin Fallavier, France) and plated on uncoated

dishes (NUNC). After an initial 40 min pre-plating, non-adherent cells were collected and transferred to a new dish. The same operation was repeated every 24 h for 7 days with the addition of a centrifugation step at 360g, followed by resuspending the pelleted non-adherent cells in fresh GM.

MDSC used for RNA extraction, I.V. and I.P. transplantation and sub-cutaneous grafting experiments were non-adherent cells obtained after 6-7 days sequential pre-plating of stem cells extracted from hind limb skeletal muscle of adult mice.

Mouse adult fibroblast (MAF) were obtained from ATCC (Ltk-11) and grown as recommended by the supplier. Mouse ESCs were grown and harvested as described⁶⁷.

Immunofluorescence analysis

Immunofluorescence analysis was performed on 2-6 week-cultured differentiated MDSC obtained from serial preplates as described¹⁰. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 5 min, snap permeabilized for 30 sec in -20°C acetone, preincubated 30 min with 0.5% BSA in PBS. Cells were then incubated for 1h at 37°C with primary antibodies against HCN4, (1:100, Alomone), sarcomeric α -actinin, clone EA-53 (1:100, Sigma-Aldrich), connexin45 (1:100, H-85, Santa Cruz Biotechnology), Cav1.3 polyclonal antibody⁵³, cardiac troponin I (1:100, Millipore), Islet1 monoclonal antibody 39.3f7 (developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242). Specific staining was revealed using anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) with Hoechst33358 nuclear stain (0.1 μ g/ml) for 30 min at 37°C.

RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from sino-atrial node tissue, ventricular tissue, ESCs, mouse adult fibroblasts, MDSC and *in vitro* cultured differentiated MDSC using RNeasy kit (Qiagen) and then treated with RQ1 DNase treatment (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Ventricular and sino-atrial node tissues were obtained from 7-week-old C57Bl/6 adult male mice. Total RNA was used to synthesize cDNA using the Superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen) with random primers or with gene-specific primer in the case of Hcn4. The gene specific primers for Hcn4, were designed from alignment of four sequences (Hcn1, Hcn2, Hcn3 and Hcn4) and chosen on the basis of a specific N-terminal Hcn4 fragment. PCR was performed with GoTaq DNA polymerase (Promega); primer sequences are shown in supplemental Table S1. The cDNA was amplified using 35 cycles of PCR with an annealing temperature of 60°C to 62°C. PCR

products were separated on 2% agarose gel (Invitrogen), stained with ethidium bromide; visualized and photographed on a UV transilluminator (Fischer Scientific). For comparative RNA expression in whole muscle cells from first preplate: PP1 (at 24h) versus the 8th preplate: PP8-MDSC shown Fig.1b: data shown are from pseudo-counts-RLE obtained after RNAseq analysis of triplicate samples from RNA banks made with the TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina) and sequencing with a HiSeq2500 Illumina sequencer (MGX Montpellier GenomiX: <http://www.mgx.cnrs.fr>)

Cell transplantation experiments

Intravenous (I.V.) and intraperitoneal (I.P.) transplantation experiments were performed using wild-type, $Ca_v1.3^{-/-}$ or $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice as recipients. MDSC were extracted from wild-type C57Bl/6 or transgenic C57Bl/6 mice expressing eGFP under the control of a beta-actin promoter⁶⁶. Approximately 5×10^5 cells per recipient mouse were resuspended in 0.9% sodium chloride solution and injected into the tail vein. Mock-transplanted $Ca_v1.3^{-/-}$ mice were injected with sodium chloride solution alone. Transplanted mice were sacrificed 2, 10, 20, 30 and 41 days after injection followed by sino-atrial node dissection. For cell tracking experiments in the SAN tissue, MDSC were labelled before injection for 30 min with the lipophilic membrane-bound cell tracker DiI-CM (C7000 at 1 μ g/ml, ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instruction.

Immunohistochemistry

Sino-atrial node tissue was dissected and fixed in 4% formaldehyde for 20 min before washing in PBS. After permeabilization in -20°C acetone, the whole SAN tissue was rehydrated with PBS. Non-specific binding of antibodies was blocked by incubation for 1h at room temperature with blocking solution (10% goat serum (Abcam), 0.1% Triton X-100 in PBS) followed by incubation with Mouse Ig Blocking Reagent (Vector Laboratories) for 30 min. Permeabilized and blocked sino-atrial tissue was then incubated overnight at 4°C with primary polyclonal anti- $Ca_v1.3-\alpha 1$ subunit antibodies (prepared as described in ref.⁵³, 1:500) diluted in 1% goat serum in PBS. Alexa488 or 555 fluorochrome goat anti-rabbit secondary antibodies (1:100, Invitrogen) in 1% goat serum were applied for 30 min at 37°C with Hoechst33358 nuclear stain (0.1 μ g/ml) for 40 min at 37°C. Autofluorescence was quenched by incubating in 1% Sudan Black B (Sigma-Aldrich) in 70% ethanol for 10 min before washing in 70% ethanol for 5 min at room temperature. Tissues were mounted with AirVol mounting medium before photomicroscopy as described in Arsic et al.¹⁰. The specificity of $Ca_v1.3$ staining was confirmed by its absence in sino-atrial tissue prepared from non-injected $Ca_v1.3^{-/-}$ mice.

Measurements of contraction frequency

Cellular contraction of differentiated MDSC-PM was measured by an edge-detection IonOptix system device (LLC, 309 Hillside Street, Milton, MA 02186, USA). Cells were grown in 35 mm dishes in complete medium and analysed on an Olympus IX71 inverted microscope. MDSC-PM were imaged at 120 Hz using an IonOptix™ Myocam-S CCD camera. Digitized images were displayed within the IonWizard™ acquisition software (IonOptix™). To measure changes in cell length, two cursors were placed at opposing edges of the cell defined as difference in optical density (maximum: dark; minimum: light). The relative movement of cursors assessed cell shortening. Experiments were performed at 36 °C.

Electrophysiological recordings of beating MDSC-PM, differentiated from MDSC in vitro

For electrophysiological recordings, aliquots of the cell suspension were harvested in custom made recording chambers (working volume 500 µL) allowing controlled unidirectional solution flow and mounted on the stage of an Olympus, X71 inverted microscope, and continuously perfused with normal Tyrode solution. The recording temperature was set to 36°C. The whole-cell variation of the patch-clamp technique⁶⁸ was used to record cellular ionic currents, employing an Axopatch 200A (Axon Instruments Inc., Foster USA) patch-clamp amplifier, grounded by an agar bridge filled with 150 mM KCl. Cellular automaticity was recorded by the perforated patch technique with eschin (50 µM). Recording electrodes were pulled from borosilicate glass, using a Flaming-Brown microelectrode puller (Sutter, Novato CA, USA). For recording cell automaticity, as well as I_f we used an intracellular solution containing (mM/L): K⁺-aspartate, 130; NaCl, 10; ATP-Na⁺ salt, 2; creatine phosphate, 6.6; GTP-Mg²⁺, 0.1; CaCl₂, 0.04 (pCa=7); HEPES-KOH, 10; (adjusted to pH=7.2 with KOH). Electrodes had a resistance of about 5 MΩ. Seal resistances were in the range of 2-5 GΩ. The extracellular solution contained (in mM/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; HEPES-NaOH, 5; and D-glucose, 5.5; (adjusted to pH=7.4 with NaOH). I_f was routinely recorded in Tyrode solution containing 5 mM BaCl₂ to block I_{K1} . Data was acquired with pClamp software (ver. 9, Axon Instruments Inc.).

Confocal imaging of $[Ca^{2+}]_i$ transients and measurements of contraction.

Intracellular Ca²⁺ ($[Ca^{2+}]_i$) transients were imaged by loading *in vitro* differentiated MDSC-PM with the Ca²⁺ indicator Fluo-4 AM 15 µM (from a stock solution in a mixture of DMSO/Pluronic F-127) in the medium for 45 min at 37°C. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients were recorded in differentiated pulsing MDSC-PM loaded with Fluo-4 AM under control conditions

(culture medium), or medium containing either epinephrine, acetylcholine (ACh) or ryanodine. Recordings were performed at 36°C. Differentiated MDSC-PM were distinguished from other cell types (i.e. fibroblasts and adipocytes cells) by their morphology (spindle and elongated shape), size (~10 µm diameter) and pulsing activity. Extended Datavideos S1-S3 show examples of differentiated MDSC-PM with typical morphology.

[Ca²⁺]_i transient images were obtained by confocal microscopy (Meta Zeiss LSM 510 and Zeiss LSM 780) scanning cells with an Argon laser in line scan configuration (1.54 ms line rate); fluorescence was excited at 488 nm and emissions collected at >505 nm. A 63x water immersion objective (n.a. 1.2), a 63x oil immersion objective (n.a. 1.32) and a 40x objective (n.a. 1.2) were used for recordings in differentiated pulsing MDSC-PM. Image analyses were performed using ImageJ software. Images were corrected for background fluorescence and the fluorescence values (F) normalized to basal fluorescence (F₀) in order to obtain the fluorescence ratio (F/F₀). Light intensity intervals were analyzed by pClamp software (ver. 9, Axon Instruments Inc.).

Microscope and video imaging system

Digital images were collected using Leica DM LB microscope and Canon EOS300D digital camera as described before¹⁰. Videos of contracting cells were recorded using a NIKON D90 camera coupled to a Zeiss Axiovert 35M. A Nanozoomer Hamamatsu blade scanner was used for 2D reconstruction of whole mount SAN tissue (in Fig. S5 and Fig. S6).

Tumour formation assay

1x10⁶ MDSC resuspended in 0.2 ml of 1/2X matrigel in HBSS were injected subcutaneously into the back of n=4 8-week-old SCID/beige mice (Charles River). Follow up observation was carried out for up to 4 months.

ESCs derived tumours were obtained by similar subcutaneous injection of 1x10⁶ mouse ESCs into the back of 8-week-old SCID/beige mice (n=2). Tumours developed in all ES-grafted mice within 2 weeks. The mice were euthanized after 4 weeks when tumour size reached more than 2 cm.

ECG recordings and analysis in sedated mice

One-lead surface ECG measurements were recorded from wild-type and Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} mice sedated with 1.5% isoflurane. Body temperature was continuously maintained at 36° -37°C using a heated pad connected to a controller that received feedback from a temperature sensor attached to the mouse. Ag/AgCl gel-coated ECG electrodes (Unomedical) were attached to the superior right and both inferior limbs of mice. The electrodes were connected to a standard one-lead ECG amplifier module (EMKA Technologies, Paris, France), which included high- and low-pass

filters (set to 0.05 Hz and 500 Hz, respectively) and a gain selection device (set to 1,000-fold). Signals were digitized continuously at 2 kHz and recorded using an IOX data acquisition system (EMKA Technologies, France). The recordings were carried out for a 45-min period before (day 0) and at different days after transplantation (day 10 and day 20). The software ecgAuto (EMKA Technologies, France) was used to perform offline analysis of the data recorded. For each mouse the mean heart rate value and the Standard Deviation (SD) were calculated. Beat-to-beat analysis of heart rate was carried out on a 30-min interval taken 10 min after the beginning of each 45-min recording.

Telemetric recordings of ECG and analysis

For telemetric ECG recording, adult wild-type and $Ca_v1.3^{-/-}$ male mice were anesthetized with 2% isoflurane. A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20, Data Sciences International) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax (chest bipolar ECG lead). Local anaesthesia was obtained with lidocaine (1%) injected subcutaneously at the sites of electrodes and transmitter implantation. To manage possible post-surgery pain, Advil (paracetamol and ibuprofene, 7 mL/l) was added to the drinking water for four days after implantation. Mice were housed in individual cages with free access to food and water and were exposed to 24-hour light/dark cycles (light, 8:30 AM to 8:30 AM) in a thermostatically controlled room. Heart rates were averaged over a 24-hour recording period or over two 12-hour periods corresponding to “day-time” (light, 8:30 AM to 8.30 PM) or “night-time” (dark, 8.30 PM to 8.30 AM). Recordings were initiated at least 8 days after recovery from surgical implantation. ECG signals were recorded using a telemetry receiver and an analog-to-digital conversion data acquisition system for display and analysis by Dataquest™ A.R.T.™ software (Data Sciences International). ECG parameters were measured using ecgAuto 1.5.7 software. RR, PR, QRS, QT and QTc intervals were first calculated automatically by ecgAuto based on a large (>250) ECG sample library and then verified by visual inspection. Heart rates (in bpm) were then determined from RR intervals. PP intervals were measured manually over shorter recording windows.

Statistical analysis

The statistical significance of measured differences in heart rates or cellular rates of contraction was evaluated through paired or unpaired Student's t test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data analysis was performed with GraphPad Prism 6.0

Author Contributions

A.F. and M.E.M. designed and analysed the experiments. P.M., D.M., I.B. performed the experiments with additional input from A.G.T., V.M., R.D., M.L.D.F., N.A., J.N., A.L. and N.J.C.; D.M. performed muscle stem cell culture and differentiation, RT-PCR analysis with advice from N.A. and immunocyto- and histochemistry with supervision from A.F. and N.J.L.; P.M. performed whole-cell patch clamp, Ca²⁺ imaging and ECG telemetric recordings with supervision from M.E.M.; J.S. provided research tools; A.F. and M.E.M wrote the manuscript with comments and approval from all co-authors.

Acknowledgements

We thank Chantal Jacquet (IGMM, Montpellier) for initial help with MDSC I.V. injection, MRI and RHEM from Biocampus Montpellier facilities, Dr. Olivier Ganier (IGH) for mouse embryonic stem cells and Dr. G Enikolopov (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) for the transgenic mouse line Nestin-eGFP described in Mignone et al. 2004. The hybridoma monoclonal antibodies Nestin (Rat-401) developed by S. Hockfield, and Islet1 39.3f7 developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

Funding.

P.M. and A.G.T. were supported by a Research Training Network (RTN) "CavNet" funded through the EU Research Programme (6FP) MRTN-CT-2006-035367. The IGF group is a member of the Laboratory of Excellence "Ion Channel Science and Therapeutics" supported by a grant from ANR (ANR-11-LABX-0015). D.M. and V.M. were supported by Association Francaise contre les Myopathies (AFM). Research supported by the Fondation pour la Recherche Medicale "Physiopathologie Cardiovasculaire" (DPC20111122986 to A.F.), by Agence Nationale de Recherche (ANR-2010-BLAN-1128-01 to MEM and AF), NIH (DC009433, HL087120 to A.L.), University of Iowa Carver Research Program of Excellence Award (to A.L.), the Austrian Science Fund (F27809 to J.S.).

References

- 1 Peault, B. *et al.* Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**, 867-877, doi:6300145 [pii] 10.1038/mt.sj.6300145 (2007).
- 2 Tamaki, T. Bridging long gap peripheral nerve injury using skeletal muscle-derived

- 3 multipotent stem cells. *Neural Regen Res* **9**, 1333-1336, doi:10.4103/1673-5374.137582 (2014).
- 4 Tamaki, T., Uchiyama, Y. & Akatsuka, A. Plasticity and physiological role of stem cells
5 derived from skeletal muscle interstitium: contribution to muscle fiber hyperplasia and
6 therapeutic use. *Curr Pharm Des* **16**, 956-967 (2010).
- 7 Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol
8 Rev* **93**, 23-67, doi:10.1152/physrev.00043.2011 (2013).
- 9 Ten Broek, R. W., Grefte, S. & Von den Hoff, J. W. Regulatory factors and cell populations
10 involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* **224**, 7-16, doi:10.1002/jcp.22127
11 (2010).
- 12 Romero-Ramos, M. *et al.* Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle.
13 *J Neurosci Res* **69**, 894-907, doi:10.1002/jnr.10374 (2002).
- 14 Alessandri, G. *et al.* Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to
15 differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* **364**, 1872-1883,
16 doi:S0140-6736(04)17443-6 [pii] 10.1016/S0140-6736(04)17443-6 (2004).
- 17 Uezumi, A. *et al.* Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle.
18 *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 864-873, doi:S0005-291X(06)00104-5 [pii]
19 10.1016/j.bbrc.2006.01.037 (2006).
- 20 Tamaki, T. *et al.* Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between
21 mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells* **25**, 2283-2290, doi:10.1634/stemcells.2006-
0746 (2007).
- Arsic, N., Mamaeva, D., Lamb, N. J. & Fernandez, A. Muscle-derived stem cells isolated as
non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp Cell
Res* **314**, 1266-1280, doi:S0014-4827(08)00019-0 [pii] 10.1016/j.yexcr.2008.01.009 (2008).
- Qu-Petersen, Z. *et al.* Identification of a novel population of muscle stem cells in mice:
potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* **157**, 851-864, doi:10.1083/jcb.200108150
jcb.200108150 [pii] (2002).
- Gharaibeh, B. *et al.* Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from
murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat Protoc* **3**, 1501-1509,
doi:nprot.2008.142 [pii] 10.1038/nprot.2008.142 (2008).
- Mangoni, M. E. & Nargeot, J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev*
88, 919-982 (2008).
- Christoffels, V. M., Smits, G. J., Kispert, A. & Moorman, A. F. Development of the
pacemaker tissues of the heart. *Circ Res* **106**, 240-254, doi:106/2/240 [pii]
10.1161/CIRCRESAHA.109.205419 (2010).
- Wiese, C. *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node
myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res* **104**, 388-397,
doi:CIRCRESAHA.108.187062 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.108.187062 (2009).
- Verheijck, E. E., Wilders, R. & Bouman, L. N. Atrio-sinus interaction demonstrated by
blockade of the rapid delayed rectifier current. *Circulation* **105**, 880-885 (2002).
- Watanabe, E. I. *et al.* Modulation of pacemaker activity of sinoatrial node cells by electrical
load imposed by an atrial cell model. *Am J Physiol* **269**, H1735-1742 (1995).
- Verheule, S. & Kaese, S. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse
models. *Front Pharmacol* **4**, 81, doi:10.3389/fphar.2013.00081 (2013).
- Mesirca, P., Torrente, A. G. & Mangoni, M. E. Functional role of voltage gated Ca(2+)
channels in heart automaticity. *Front Physiol* **6**, 19, doi:10.3389/fphys.2015.00019 (2015).
- Jensen, P. N. *et al.* Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general
population. *J Am Coll Cardiol* **64**, 531-538, doi:S0735-1097(14)02843-5 [pii]
10.1016/j.jacc.2014.03.056 (2014).
- Mond, H. G. & Proclemer, A. The 11th world survey of cardiac pacing and implantable
cardioverter-defibrillators: calendar year 2009--a World Society of Arrhythmia's project.
Pacing Clin Electrophysiol **34**, 1013-1027, doi:10.1111/j.1540-8159.2011.03150.x (2011).

- 22 Rosen, M. R., Robinson, R. B., Brink, P. R. & Cohen, I. S. The road to biological pacing. *Nat Rev Cardiol* **8**, 656-666, doi:mrcardio.2011.120 [pii] 10.1038/mrcardio.2011.120 (2011).
- 23 Besson, V. *et al.* PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11470-11475, doi:10.1073/pnas.1103873108 (2011).
- 24 Hoogaars, W. M. *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* **21**, 1098-1112 (2007).
- 25 Ye, W. *et al.* A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development* **142**, 2521-2532, doi:10.1242/dev.120220 (2015).
- 26 Hashem, S. I. *et al.* Shox2 regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies. *Stem Cells Dev* **22**, 2915-2926, doi:10.1089/scd.2013.0123 (2013).
- 27 Weinberger, F. *et al.* Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circ Res* **110**, 1303-1310, doi:CIRCRESAHA.111.259630 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.111.259630 (2012).
- 28 Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591 (1998).
- 29 Brown, H. F., DiFrancesco, D. & Noble, S. J. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**, 235-236 (1979).
- 30 Mangoni, M. E. *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5543-5548 (2003).
- 31 Alig, J. *et al.* Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12189-12194 (2009).
- 32 Baruscotti, M. *et al.* Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1705-1710, doi:1010122108 [pii] 10.1073/pnas.1010122108 (2011).
- 33 Mesirca, P. *et al.* Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of 'funny' (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat Commun* **5**, 4664, doi:ncomms5664 [pii] 10.1038/ncomms5664 (2014).
- 34 Torrente, A. G. *et al.* L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca²⁺ release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* **109**, 451-461, doi:cvw006 [pii] 10.1093/cvr/cvw006 (2016).
- 35 Milanese, R., Baruscotti, M., Gnecci-Ruscone, T. & DiFrancesco, D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* **354**, 151-157 (2006).
- 36 Baig, S. M. *et al.* Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* **14**, 77-84, doi:nn.2694 [pii] 10.1038/nn.2694 (2011).
- 37 Verheijck, E. E. *et al.* Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res* **52**, 40-50 (2001).
- 38 DiFrancesco, D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* **106**, 434-446, doi:106/3/434 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041 (2010).
- 39 Bois, P., Bescond, J., Renaudon, B. & Lenfant, J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* **118**, 1051-1057 (1996).
- 40 Sah, R. *et al.* Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3037-3046, doi:1311865110 [pii] 10.1073/pnas.1311865110 (2013).
- 41 Chen, B., Wu, Y., Mohler, P. J., Anderson, M. E. & Song, L. S. Local control of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse sinoatrial node cells. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 706-715, doi:S0022-2828(09)00276-4 [pii] 10.1016/j.yjmcc.2009.07.007 (2009).
- 42 Mesirca, P. *et al.* G protein-gated IKACH channels as therapeutic targets for treatment of

- sick sinus syndrome and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E932-941, doi:1517181113 [pii] 10.1073/pnas.1517181113 (2016).
- 43 Lakatta, E. G., Maltsev, V. A. & Vinogradova, T. M. A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res* **106**, 659-673, doi:106/4/659 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.109.206078 (2010).
- 44 Platzter, J. *et al.* Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* **102**, 89-97 (2000).
- 45 Zhang, Z. *et al.* Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* **90**, 981-987. (2002).
- 46 Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Heart regeneration. *Nature* **473**, 326-335, doi:nature10147 [pii] 10.1038/nature10147 (2011).
- 47 Kleger, A. *et al.* Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. *Circulation* **122**, 1823-1836, doi:CIRCULATIONAHA.110.971721 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971721 (2010).
- 48 Chauveau, S. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Provide In Vivo Biological Pacemaker Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **10**, e004508, doi:CIRCEP.116.004508 [pii] 10.1161/CIRCEP.116.004508 (2017).
- 49 Protze, S. I. *et al.* Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat Biotechnol* **35**, 56-68, doi:10.1038/nbt.3745 (2017).
- 50 Mitutsova, V. *et al.* Adult muscle-derived stem cells engraft and differentiate into insulin-expressing cells in pancreatic islets of diabetic mice. *Stem Cell Res Ther* **8**, 86, doi:10.1186/s13287-017-0539-9 (2017).
- 51 Miller, R. J., Banisadr, G. & Bhattacharyya, B. J. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J Neuroimmunol* **198**, 31-38, doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.008 (2008).
- 52 Stumm, R. & Holtt, V. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J Mol Endocrinol* **38**, 377-382, doi:10.1677/JME-06-0032 (2007).
- 53 Christel, C. J. *et al.* Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol* **590**, 6327-6342, doi:jphysiol.2012.239954 [pii] 10.1113/jphysiol.2012.239954 (2012).
- 54 Marger, L. *et al.* Functional roles of Ca(v)1.3, Ca(v)3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels (Austin)* **5**, 251-261, doi:15266 [pii] (2011).
- 55 Menasche, P. Stem cell therapy for chronic heart failure: lessons from a 15-year experience. *C R Biol* **334**, 489-496, doi:10.1016/j.crvi.2011.03.006 (2011).
- 56 Boink, G. J. *et al.* HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomically responsive biological pacing at physiological heart rates. *J Am Coll Cardiol* **61**, 1192-1201, doi:S0735-1097(13)00182-4 [pii] 10.1016/j.jacc.2012.12.031 (2013).
- 57 Kapoor, N., Liang, W., Marban, E. & Cho, H. C. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat Biotechnol* **31**, 54-62, doi:10.1038/nbt.2465 (2013).
- 58 Okada, M. *et al.* Human skeletal muscle cells with a slow adhesion rate after isolation and an enhanced stress resistance improve function of ischemic hearts. *Mol Ther* **20**, 138-145, doi:10.1038/mt.2011.229 (2012).
- 59 Mohsin, S., Siddiqi, S., Collins, B. & Sussman, M. A. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* **109**, 1415-1428, doi:109/12/1415 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.111.243071 (2011).
- 60 Ellison, G. M. *et al.* Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* **154**, 827-842 (2013).

- 61 Macaluso, F. & Myburgh, K. H. Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *J Muscle Res Cell Motil* **33**, 187-198, doi:10.1007/s10974-012-9302-0 (2012).
- 62 Quaini, F. *et al.* Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* **346**, 5-15, doi:10.1056/NEJMoa012081 (2002).
- 63 Laflamme, M. A., Myerson, D., Saffitz, J. E. & Murry, C. E. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* **90**, 634-640 (2002).
- 64 Murray, M. A. & Robbins, N. Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse. *Neuroscience* **7**, 1817-1822 (1982).
- 65 Semelka, M., Gera, J. & Usman, S. Sick sinus syndrome: a review. *Am Fam Physician* **87**, 691-696, doi:d10507 [pii] (2013).
- 66 Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319, doi:S0014-5793(97)00313-X [pii] (1997).
- 67 Ganier, O. *et al.* Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic *Xenopus* egg extracts and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17331-17336, doi:1100733108 [pii] 10.1073/pnas.1100733108 (2011).
- 68 Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **391**, 85-100 (1981).

Figure 1

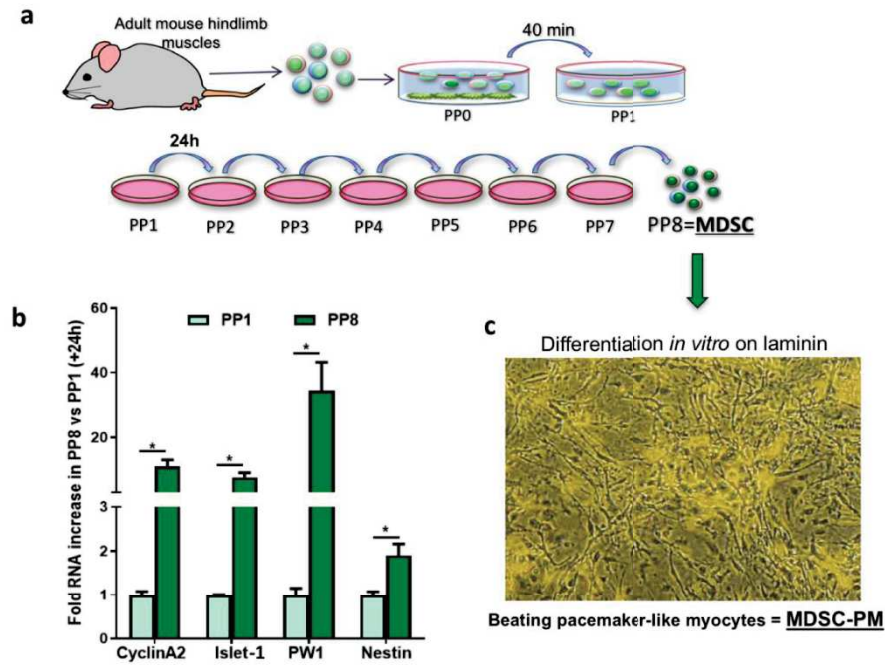


Fig 1. Muscle stem cell isolation, expression of stemness factors, and differentiation of pacemaker-like cells *in vitro*. **a:** Schematic overview of the protocol for isolating non-adherent muscle-derived stem cells (MDSCs) from mouse hind-limb muscle. **b:** Levels of RNA expression for *CyclinA2*, *Islet-1*, *Peg3/PW1*, and *Nestin* in PP1 muscle cells cultured for 24 hours versus MDSC PP8 cells, as determined by RNAseq profiling of independent replicates. Shown are the fold increase in PP8 MDSCs vs. PP1 cells (levels in PP1 cells normalized as 1x). * $p < 0.05$. **c:** Phase-contrast image of MDSCs differentiated into muscle stem cell-derived pacemaker myocytes (MDSC-PMs) after 3 weeks on laminin. The field is the same as that shown in Supplementary video 1.

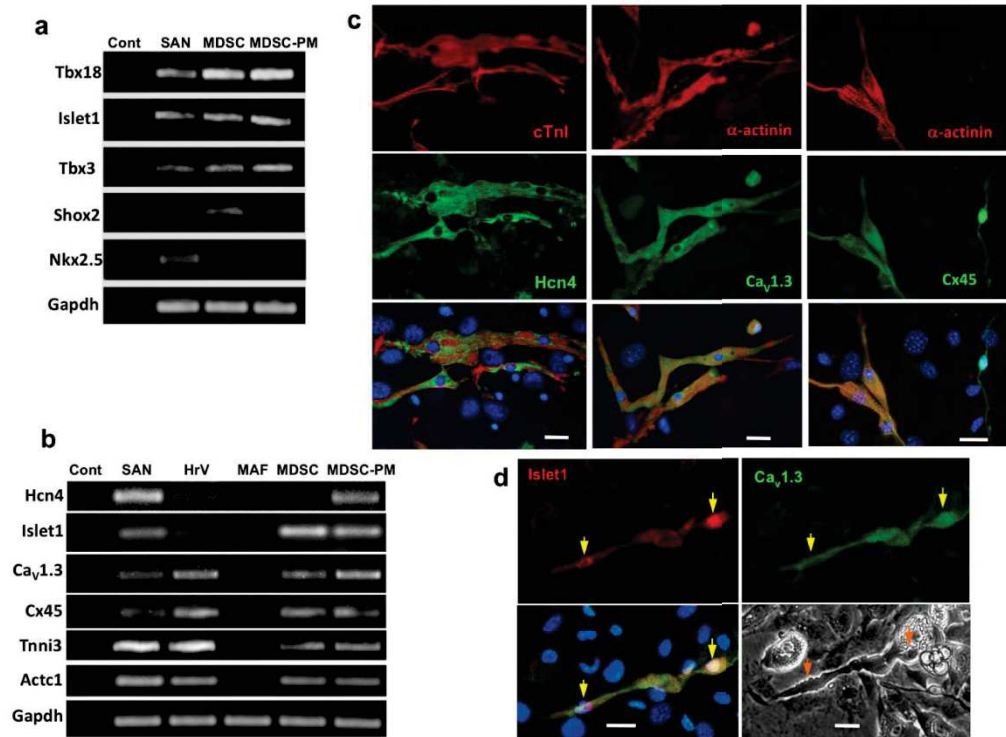
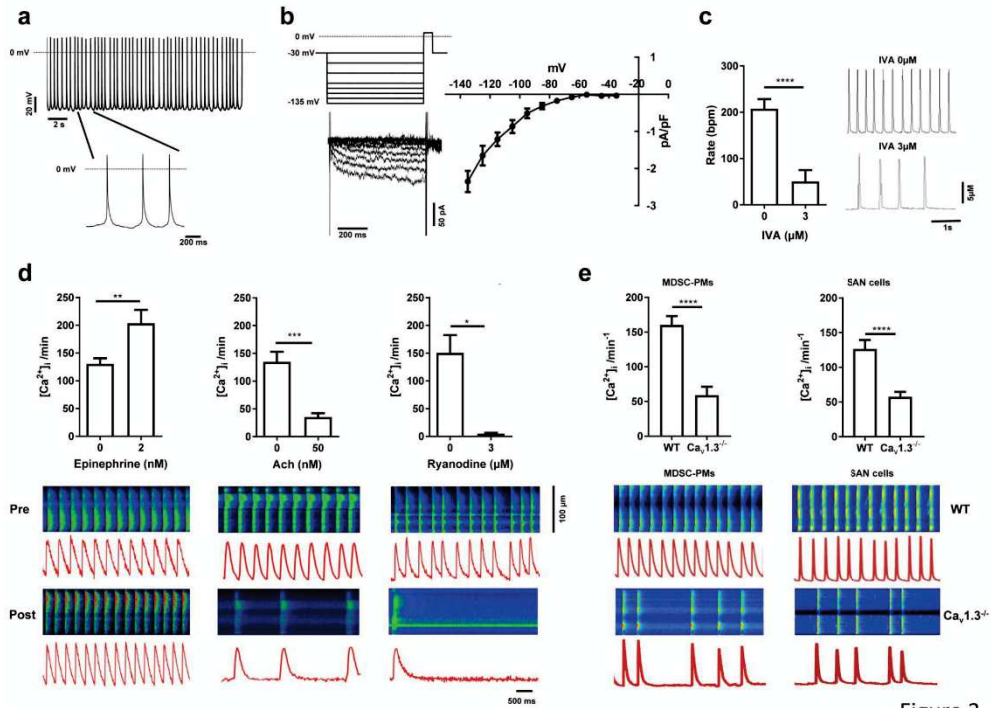


Fig 2. Expression of sino-atrial markers in MDSCs and in MDSC-PMs differentiated *in vitro* from MDSCs. a. RT-PCR-based analysis of expression of transcription factors involved in sino-atrial node (SAN) development (Tbx18, Islet1, Tbx3, Shox2 and Nkx2.5). SAN: mouse sino-atrial node; MDSCs: muscle-derived stem cell; MDSC-PMs: MDSCs differentiated *in vitro* into pacemaker-like beating cells. GAPDH was used as loading control. **b.** RT-PCR-based analysis of expression of cardiac pacemaker-specific markers in mouse. HCN4; Islet-1; Cav1.3; Cx45 (Connexin45); Tnni3 (cardiac Troponin I); Actc1 (cardiac α -actinin). SAN, heart ventricles (HrV); mouse adult fibroblasts (MAF). Control without cDNA are indicated as Cont. Results for (a) and (b) are representative of analysis of n=3 independent MDSC and MDSC-PM RNA preparations. **c.** Co-immunostaining of MDSC-PMs for HCN4 and cardiac TroponinI (cTnI); sarcomeric α -actinin and Cav1.3; and sarcomeric α -actinin and Connexin45 (Cx45). **d.** Co-immunostaining for Islet1 and Cav1.3, and phase-contrast image of 2 beating MDSC-PMs (indicated by arrows) that are also shown in Supplementary video S4. Immunostaining is representative of n=20 independent cultures of MDSC-PMs from wild-type mouse muscle. Scale bars, 10 μ m.



25

Figure 4

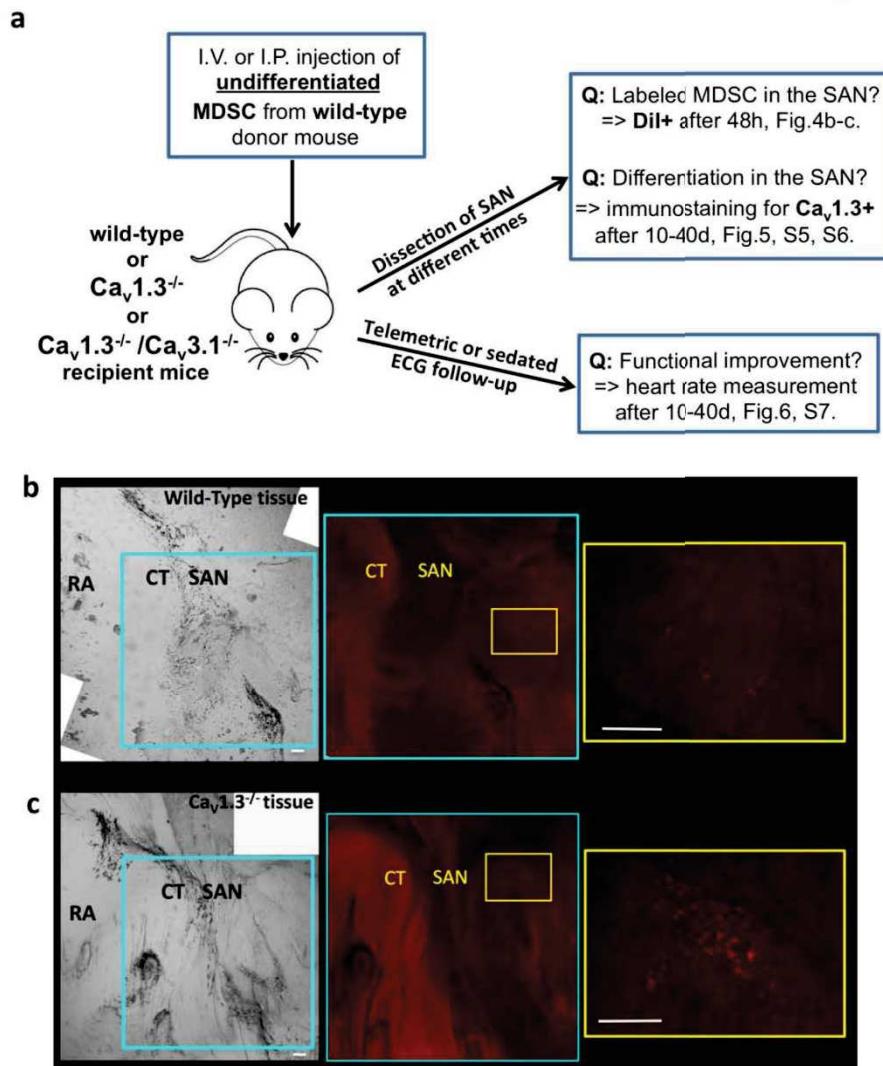
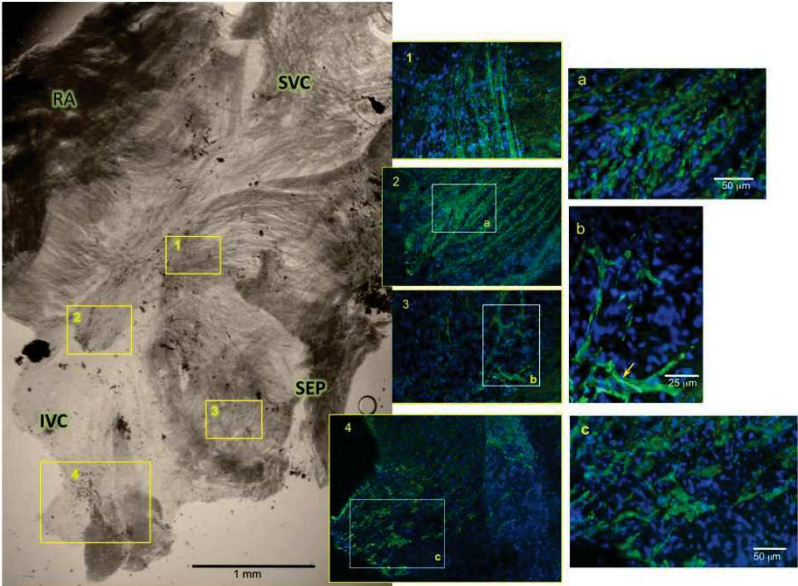


Fig. 4 Summary of *in vivo* experiments with bradycardic mutant mice and early engraftment to the SAN by MDSCs. **a.** Schematic representation of assays testing the reparative potential of MDSCs *in vivo*. **b-c.** Assays of MDSC migration and engraftment to SAN tissue, in age- and sex-matched wild-type and $Ca_v1.3^{-/-}$ mice 48 hours after I.P. injection with 3×10^5 MDSCs pre-labelled with the membrane marker Dil for. **b.** SAN tissue from a male wild-type mouse injected with Dil-MDSCs. **c.** SAN tissue from a male $Ca_v1.3^{-/-}$ mouse injected with Dil-MDSCs. Shown are representative bright-field images at 60x and close-ups (areas shown by frames) of red fluorescence (Dil). RA: right atrium; CT: crista terminalis; SAN: sino-atrial node area. Bar = 200 microns.

Figure 5



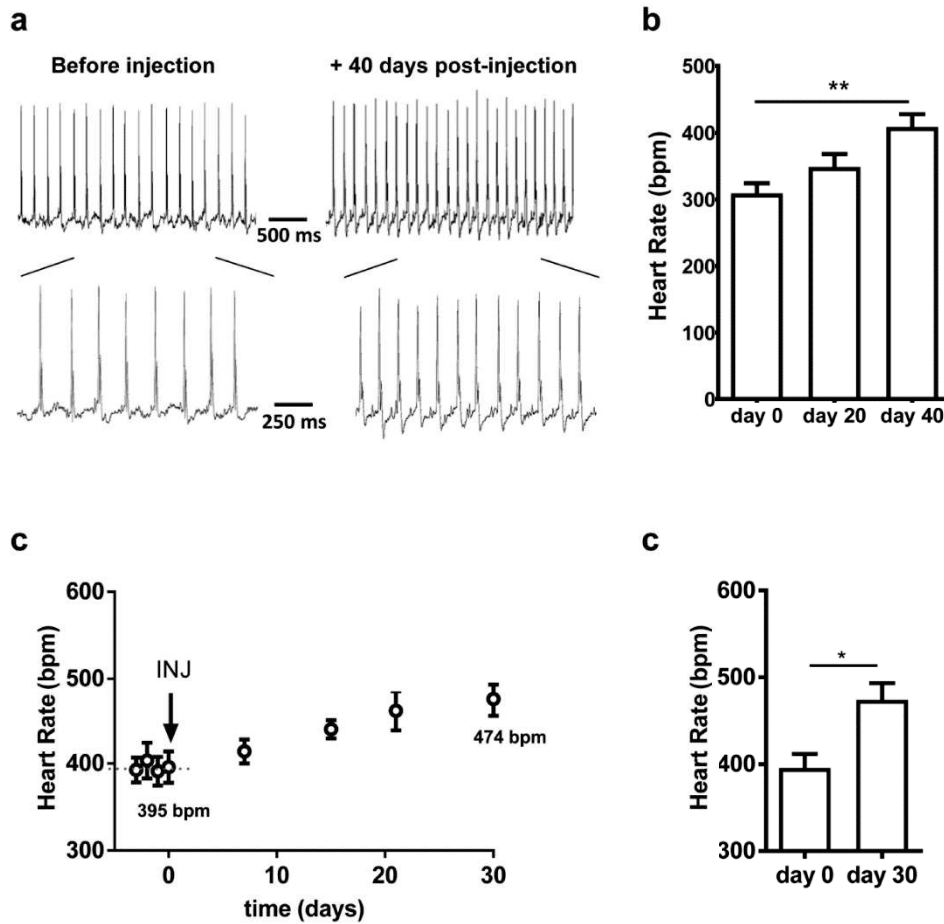


Fig. 6. *In vivo* recordings of heart rate in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ single-mutant and $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ double-mutant mice before and after transplantation of MDSCs from wild-type muscle. **a.** Samples of *in vivo* telemetric ECG recordings from a freely moving $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mouse before and after systemic transplantation (I.V. injection) of MDSCs. **b.** Quantitation of 24-hour telemetric recordings of heart rate in $n=6$ $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice (see Table 1), before and up to 40 days after systemic transplantation of MDSCs. Data are presented as mean \pm S.E.M. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; **c.** Quantitation of *in vivo* telemetric heart rate recordings in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ double mutant mice before and after systemic transplantation of MDSCs (I.P. injection). **d.** Quantitation of heart rate recorded in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}/\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice before (day 0) and on day 30 after I.P. transplantation of MDSCs from wild-type mice.

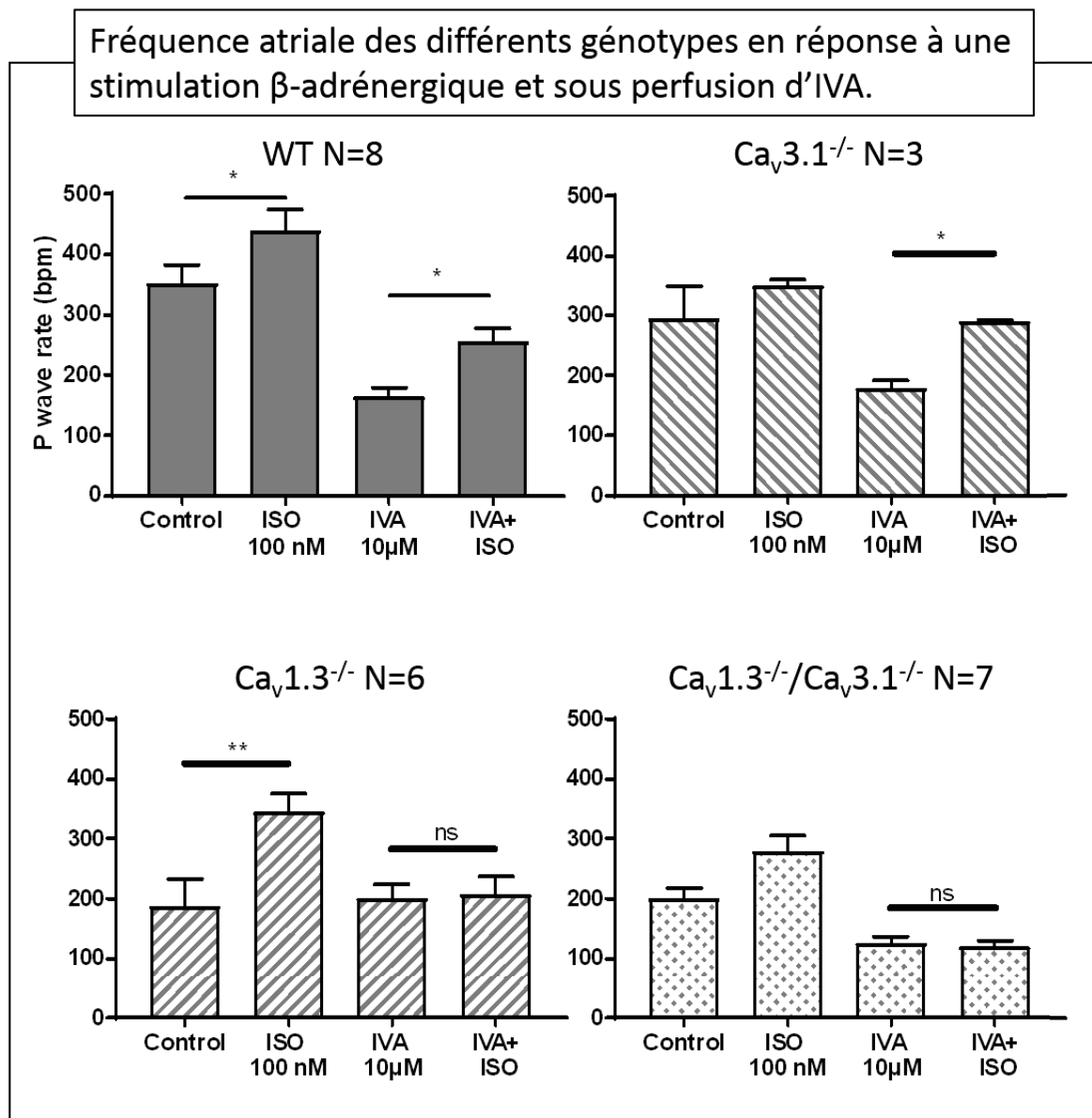
Table 1. Telemetric ECG intervals for transplanted $Ca_v1.3^{-/-}$ and wild-type mice during 12 hours resting (day) time. Shown are the values of the ECG parameters and the presence of sinus (SAN) pauses and 2nd-degree atrioventricular blocks (AVBII), (mean \pm S.E.M.).

	$Ca_v1.3^{-/-}$ before injection	$Ca_v1.3^{-/-}$ 40 days post-injection	n	p value $Ca_v1.3^{-/-}$	Wild-type before injection	Wild-type 40 days post-injection	n	p value WT
Heart rate (bpm)	310 \pm 15	410 \pm 19	6	0.012	568 \pm 6	548 \pm 2	4	ns
PP (ms)	215 \pm 6	169 \pm 6	6	0.006	115 \pm 6	112 \pm 1	4	ns
PR (ms)	55 \pm 2	51 \pm 1	6	ns	34 \pm 1	35 \pm 1	4	ns
QRS (ms)	17 \pm 1	16 \pm 1	6	ns	10 \pm 1	10 \pm 1	4	ns
QT (ms)	71 \pm 5	66 \pm 3	6	ns	43 \pm 1	41 \pm 1	4	ns
QTc (ms)	50 \pm 3	52 \pm 2	6	ns	41 \pm 1	39 \pm 1	4	ns
SAN pauses/60s	0.9 \pm 0.5	0.3 \pm 0.1	6	ns	0	0	4	ns
AVBII/60s	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	6	ns	0	0	4	ns

Table 2. Telemetric ECG intervals for transplanted $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice during 6 hours active (night) time. Summary of ECG parameters recorded in n=6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ double mutant mice before (day 0) and after (day 30) 30 days following I.P. transplantation of wild-type MDSCs. Shown are the values of the ECG parameters and the presence of sinus (SAN) pauses and 2nd-degree atrioventricular blocks (AVBII), (mean \pm S.E.M.).

	Day 0	Day 30	n	p value
PP (ms)	169 \pm 8	135 \pm 8	6	0.011
PR (ms)	54 \pm 2	52 \pm 1	6	ns
QRS (ms)	15 \pm 1	15 \pm 1	6	ns
QT (ms)	64 \pm 3	62 \pm 6	6	ns
QTc (ms)	50 \pm 2	53 \pm 4	6	ns
SAN pauses/60s	6 \pm 2	2 \pm 1	6	ns
AVBII/60s	6 \pm 1	4 \pm 2	6	ns

Les études précédentes décrites dans ce manuscrit montrent l'importance capitale de la voie de régulation β -adrénergique sur l'activité *pacemaker* cardiaque. Au sein de notre équipe, nous étudions autant cette modulation fondamentale que la génération de l'automatisme cardiaque. Sur des coeurs isolés en perfusion par le système Langendorff, la combinaison de la mutation perte de fonction de $Ca_v1.3$ et l'inhibition d'HCN par l'IVA 10 μ M rend l'activité cardiaque insensible à l'ISO 100 nM.



Ces résultats préliminaires montrent que la fréquence atriale (onde P/min) mesurée n'accélère pas sans $Ca_v1.3$ sous perfusion d'IVA 10 μ M. (Holm-Sidak's multiple comparisons test).

Résumé

L'automatisme cardiaque est généré par un mécanisme fondamental partiellement compris et controversé, initié par des cardiomyocytes spécialisés dans le nœud sino-atrial (NSA). Ces cellules *pacemaker* (cNSAs) présentent une phase spontanée de dépolarisation diastolique (DD), qui mène le potentiel de membrane de la fin de la repolarisation du potentiel d'action (PA) au seuil de déclenchement du PA suivant. Cette activité spontanée implique plusieurs canaux ioniques à la surface de la membrane plasmique et la dynamique calcique intracellulaire. Les cardiomyocytes contractiles du myocarde expriment majoritairement le canal calcique $Ca_v1.2$ tandis que les cNSAs en expriment d'autres isoformes. Ce sont les canaux calciques de type L (LTCC) $Ca_v1.3$ et de type T (TTCC) $Ca_v3.1$, qui sont impliqués dans la DD. Les souris génétiquement modifiées pour $Ca_v1.3$ et/ou $Ca_v3.1$ ont des caractéristiques physiopathologiques et sont utilisées comme modèle d'étude des dysfonctions sinusales de l'homme. La cartographie optique du NSA isolé a permis de révéler une activité électrophysiologique intrinsèque altérée par les mutations. L'expérimentation en *patch clamp* et en imagerie calcique des cNSAs isolées montrent que les mutations altèrent la mécanistique cellulaire du *pacemaker*. Le couplage de ces approches à l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques a permis d'évaluer la contribution des différents éléments à cette mécanistique cellulaire et de préciser les controverses sur les fondements de l'automatisme cardiaque. Cette thématique de recherche présente des enjeux majeurs dans le domaine de la santé puisque les perspectives thérapeutiques et les stratégies pharmacologiques pour traiter les dysfonctions sinusales nécessitent une connaissance intégrale du mécanisme.

Mots clefs : Nœud sinusal, pacemaker, canaux calciques, dépolarisation diastolique, souris génétiquement modifiée, électrophysiologie cardiaque.