



HAL
open science

Normalisation de la fréquence cardiaque et de la conduction auriculo-ventriculaire dans des modèles de bradycardie congénitale par l'inhibition pharmacologique du courant I_{KCh}

Antony Chung You Chong

► To cite this version:

Antony Chung You Chong. Normalisation de la fréquence cardiaque et de la conduction auriculo-ventriculaire dans des modèles de bradycardie congénitale par l'inhibition pharmacologique du courant I_{KCh} . Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. <NNT : 2019MONTT002>. <tel-02119313>

HAL Id: tel-02119313

<https://theses.hal.science/tel-02119313v1>

Submitted on 3 May 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.



HAL Authorization

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

en Électrophysiologie cardiaque

École doctorale Science Chimique et Biologie pour la Santé

Unité de recherche Unité de recherche UMR 5203
« Physiopathologie cardiaque et cardioprotection »

Normalisation de la fréquence cardiaque et de la conduction auriculo-ventriculaire dans des modèles de bradycardie congénitale par l'inhibition pharmacologique du courant I_{KACH}

Présentée par Antony CHUNG YOU CHONG
le 16 avril 2019

Sous la direction de Matteo Elia MANGONI
et Anne VINCENT

Devant le jury composé de

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

Anne Vincent, MCF, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier

Jean-Yves Le Guennec, Pr, Université de Montpellier

Jacques Barhanin, DR, LP2M, Nice

Oxana Kunduzova, CR, Toulouse

Flavien Charpentier, DR, Institut du Thorax, Nantes

Sylvie Diochot, IR, IPMC, Valbonne

Pietro Mesirca, CR, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Invité

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A ma grand-mère,

A mon grand-père,

A ma mère,

A ma sœur,

A mon frère,

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison
avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une
science qu'un tas de pierres n'est une maison »*

Henri Poincaré

Préface

Chaque battement du cœur prend son origine dans l'oreillette droite par une impulsion électrique spontanée dans la région du nœud sinusal. L'impulsion provoque initialement la contraction des deux oreillettes, puis active le nœud auriculo-ventriculaire et enfin, l'impulsion électrique se propage dans les ventricules *via* le faisceau de His et des fibres de Purkinje, provoquant la contraction ventriculaire.

Un défaut de la génération de l'impulsion sinusale est appelé en clinique « dysfonction sinusale ». L'implantation d'un pacemaker électronique est nécessaire pour rétablir l'activité coordonnée du cœur. Cependant, les programmes d'implantation de pacemaker sont coûteux car cela demande une surveillance continue. Les effets secondaires ne sont pas non plus négligeables et des complications suite à l'implantation peuvent intervenir. Il est donc important de trouver une stratégie pharmacologique innovante pour proposer une alternative économique et sociétale au pacemaker électronique.

Remerciements

Les personnes qui liront ce manuscrit se demanderont sans doute pourquoi la section des remerciements est assez longue. La réponse est simple : un travail de thèse ne peut aboutir sans l'aide d'un certain nombre de personnes.

« L'unique moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder ». Alors j'y cède en remerciant les personnes toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont soutenu et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette aventure. Après ces quatre années passées au laboratoire, je ne suis pas certain que de simples mots suffiront à vous dire merci comme vous le méritez...

A Matteo Mangoni,

Je tiens à te remercier en premier lieu. Merci de m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire, d'abord en tant que stagiaire puis en tant que doctorant. Je te remercie pour ton écoute et de tes discussions scientifiques, ainsi que l'aide que tu m'as apporté tout au long de ces années. J'ai toujours été admiratif devant ta passion pour la recherche, ton grand savoir, mais surtout pour tes qualités humaines et ton accessibilité.

A Isabelle Bidaud,

Je voudrais te remercier tout particulièrement pour ton excellent encadrement, mais aussi ton côté humain et ton dynamisme. Ton sourire présent chaque jour m'a rassuré dans les périodes de stress et de doute. Une aventure qui dure depuis presque 5 ans maintenant ! Tes qualités exceptionnelles dont ta gentillesse et ta clairvoyance ont été la clé de l'aboutissement de ma thèse. Tes conseils avisés et toujours constructifs m'ont permis de me forger. Je n'oublierai jamais ton soutien et ta disponibilité dans les moments durs malgré tes nombreuses charges de travail.

A Pietro Mesirca,

Je tiens à te remercier infiniment pour tes conseils, pour ta bonne humeur, ainsi que m'avoir accompagné tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir boosté. Merci à toi pour les nombreuses discussions scientifiques que l'on a pu avoir ensemble. Merci à toi d'avoir été en quelque sorte mon tuteur et de m'avoir permis d'avancer continuellement.

A Angelo Torrente,

Je te remercie pour ce que tu m'as apporté. Merci à toi de m'avoir fait profiter de ton expérience et tes conseils. Je te souhaite bon courage pour la suite, ne baisse pas les bras.

A Anne Vincent,

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude. Tes conseils avisés m'ont beaucoup apporté durant ces 4 années de thèses. Merci de m'avoir partagé tes connaissances et d'avoir trouvé des solutions à nos problèmes. Tu m'as transmis tes petits trucs et astuces utiles pour le quotidien.

A Stéphanie Barrère,

Je te remercie pour tes conseils que ça soit de la recherche ou du quotidien. Merci pour ton optimisme.

Et bien sûr, un grand MERCI à tous les étudiants de mon équipe, *Leïla Talssi, Charlotte Sarre et Julien Louradour*. Vous faites vivre ce laboratoire. Je vous remercie pour ces moments partagés!

A Christian Barrère,

Merci pour tes encouragements et ton dynamisme chaque jour.

A toute l'équipe « physiopathologie cardiaque et protection »,

Aurélie Covinhes et Laura Gallot merci pour la bonne humeur, vous faites vivre également ce laboratoire. Merci à *Joël Nargeot*.

J'exprime mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury. D'abord au Docteurs *Jacques Barhanin* et *Oxana Kunduzova*, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit et à l'élaboration de leurs rapports. Merci au Pr *Jean-Yves Le Guennec* et au Dr *Flavien Charpentier* d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs. Vous m'avez vu grandir, évoluer et soutenu, merci pour ces quatre années. Sans oublier *Sylvie Diochot* pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également **Agnès Carcouet**, sans qui je n'aurai pas pu faire une partie de mes expériences à Nantes.

J'exprime aussi tous mes remerciements aux membres de l'institut, les « **Eric**s », **Céline Garnier**, **Lionel Quentin**, les techniciens du plateau iExplore et à tous les services communs sans qui je n'aurai pas pu travailler.

Au Dr Laurence Cadieux, à Bernard Frances et à Nicole Perez

Merci d'avoir cru en moi durant toutes ces années, merci de m'avoir tant apporté et soutenu dans les moments les plus durs de ma vie. Merci à toi Bernard, tu as été un protecteur envers moi et tu as été un père. Merci à toi Laurence de m'avoir supporté et de m'avoir conseillé et orienté. Sans vous je ne serai pas qui je suis aujourd'hui. J'ai une profonde et immense gratitude. Merci à toi Nicole d'avoir été une figure maternelle.

A Audrey Douanier,

Je te remercie pour tes nombreux conseils avisés rempli de sagesse, merci d'être toi, merci de m'avoir soutenu, tu es une amie en or. Je te souhaite beaucoup de réussite future.

A Fabrice Lallemand,

Je te remercie mon frère pour tout ce que tu m'as apporté, mon côté humain et ma gentillesse vient de toi. Tu m'as tellement appris de la vie et à me préserver.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille. Merci à ma mère et à mon frère qui ont été présents pour moi. Merci à Surya Payet, merci pour ton soutien ton affection, je suis parfois insupportable surtout ces derniers temps mais tu as su m'apaiser et m'éclairer quand il faut et où il faut. Merci pour ton soutien sans faille. Ma dernière pensée ira à mes grands-parents qui ont toujours cru en moi, soutenu jusqu'au bout et quelques soit mes choix. Je suis devenu ce que je suis grâce à vous, vous êtes mes héros. Vous m'avez tellement apporté, je ne saurai comment vous remercier. *Mi aim a zot dou dou com lé miel.*

Un petit clin d'œil à **Narayan Payet**, **Matthias Baudot**, **Eleonora Torre**, à **Julie Preciat**, à **Handiversité** et aux différents corps médicaux qui m'ont accompagné.

Résumé

Correction de la bradycardie et des troubles de conduction dans des modèles de dysfonction congénitale de l'automatisme cardiaque par l'inhibition pharmacologique du courant I_{KACH}

La dysfonction du nœud sinusal (DNS) est l'une des principales pathologies de l'automatisme cardiaque. La DNS désigne une multitude de troubles caractérisée par l'incapacité du nœud sinusal (SAN) à générer ou à conduire l'impulsion cardiaque. La seule thérapie actuellement disponible pour la DNS est l'implantation d'un pacemaker électronique. Des études épidémiologiques prévoient un nombre croissant d'implantation de pacemakers électroniques au cours des 50 prochaines années à cause du vieillissement de la population. Le développement de thérapies innovantes pour la DNS est donc un enjeu médical et sociétal important. Comme notre équipe l'a déjà proposé, l'inhibition pharmacologique du courant potassique activé par l'acétylcholine (I_{KACH}) pourrait constituer une nouvelle option thérapeutique pour traiter la DNS.

Nous avons donc testé l'inhibition du courant I_{KACH} par un peptide extrait du venin d'abeille, la tertiapine-Q, pour corriger le DNS et le dysfonctionnement de la conduction chez des souris modèle de pathologies cardiaque humaine. En particulier, nous avons étudié les souris portant l'inactivation des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ ($Ca_v1.3^{-/-}$), les souris portant simultanément l'ablation de $Ca_v1.3$ et des canaux calciques de type T $Ca_v3.1$ ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$), les souris porteuses d'une perte de fonction des canaux HCN4 (HCN4-CNBD) et les souris haplo-suffisantes $Na_v1.5$ ($Scn5a^{+/-}$). Nous avons enregistré, par télémétrie, l'ECG chez ces modèles murins avant et après l'administration de différentes doses de tertiapine-Q.

L'inhibition du courant I_{KACH} par la tertiapine-Q prévient les dysfonctions sinusales et améliore la conduction auriculo-ventriculaire dans ces modèles de bradycardie congénitale. Nos résultats ouvrent la possibilité d'un développement d'un ciblage pharmacologique d' I_{KACH} afin de parvenir à corriger la DNS et les troubles de la conduction.

Mots clés : Nœud sinusal, activité pacemaker cardiaque, canaux ioniques, maladie rythmique de l'oreillette, courant I_{KACH}

Abstract

Inhibition of $I_{K_{ACH}}$ channels by the bee venom peptide tertiapin-Q rescues inherited cardiac conduction defects, sino-atrial bradycardia, and atrioventricular block in models of congenital dysfunction

Sinus node dysfunction (SND) is a widespread disease of heart automaticity. SND refers to a multitude of sinus node (SAN) disorders characterized by failure to generate or conduct the cardiac impulse. The only currently available therapy for chronic SND is the implantation of an electronic pacemaker. Epidemiological studies forecast an increasing need for pacemaker implantation during the next 50 years, with the ageing of the population. It is thus an important medical and societal issue, to develop innovative therapies for SND. As previously proposed by our team, pharmacologic inhibition of the G-protein activated K^+ current ($I_{K_{ACH}}$) could be a new therapeutic option to treat bradycardia and SND associated with other cardiac pathologies.

We tested whether inhibition of $I_{K_{ACH}}$ by the peptide tertiapin-Q could rescue SND and conduction dysfunction in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice carrying ablation of L ($Ca_v1.3$) or/and T-type ($Ca_v3.1$) calcium channels; mice carrying loss-of-function of f-channels (HCN4-CNBD) and Nav1.5 ($Scn5a^{+/-}$) mice.

We employed telemetric ECG recordings of heart rate (HR) in mice before and after administration of different doses of Tertiapin-Q.

Pharmacological inhibition of $I_{K_{ACH}}$ by tertiapin-Q prevents SAN dysfunction and improves conduction in three models of congenital bradycardia suggesting the possibility of pharmacologic development of $I_{K_{ACH}}$ targeting to manage SND and conduction disease, to delay or replace the implantation of an electronic pacemaker.

Keywords: Sino-atrial node, cardiac pacemaker activity, ion channels, sick sinus syndrome, pharmacological inhibition, $I_{K_{ACH}}$

Table des matières

| | |
|---|----|
| Préface..... | 5 |
| Remerciements..... | 7 |
| Résumé..... | 11 |
| Abstract..... | 13 |
| Index des illustrations..... | 17 |
| Index des tableaux..... | 19 |
| Liste des abréviations..... | 21 |
| Valorisation des travaux de recherche..... | 23 |
| INTRODUCTION..... | 27 |
| 1. Notions historiques sur la découverte du système de conduction cardiaque..... | 29 |
| 2. Automatisme cardiaque et système de conduction..... | 33 |
| 2.1 Le nœud sinusal (SAN)..... | 35 |
| 2.2 Le nœud auriculo-ventriculaire..... | 36 |
| 2.3 Faisceau de His et fibres de Purkinje..... | 37 |
| 2.4 Communication intercellulaire au sein du tissu nodal : rôle des connexines.... | 40 |
| 2.5 Régulation par le système nerveux autonome..... | 42 |
| 3. La cellule pacemaker..... | 44 |
| 3.1 Description des courants ioniques impliqués dans la génération du rythme | 44 |
| 3.2 Description du potentiel d'action pacemaker..... | 59 |
| 4. Physiopathologie de l'automatisme cardiaque: la maladie rythmique de l'oreillette | 61 |
| 5. La tertiapine-Q..... | 68 |
| OBJECTIFS DE LA THESE..... | 71 |
| MATERIEL ET METHODES..... | 75 |
| 6. Modèle murins..... | 77 |
| 1.1 Souris $Ca_v1.3$ KO ($Ca_v1.3^{-/-}$)..... | 77 |

| | |
|--|-----|
| 1.2 Souris Cav3.1 KO (Cav3.1 ^{-/-}) | 79 |
| 1.3 Souris double KO Cav1.3 et Cav3.1 (Cav1.3 ^{-/-} /Cav3.1 ^{-/-}) | 79 |
| 1.4 Souris Girk4 KO (Girk4 ^{-/-}) | 80 |
| 1.5 Souris double KO Cav1.3 ^{-/-} /Girk4 ^{-/-} | 81 |
| 1.6 Souris HCN4-CNBD | 81 |
| 1.7 Souris Scn5a ^{+/-} (Nav1.5 ^{+/-}) | 82 |
| 1.8 Souris WT | 83 |
| 7. Enregistrement télémétrique des ECG <i>in vivo</i> | 84 |
| 2.1 Implantation des transmetteurs en sous-cutané | 85 |
| 2.2 Analyse des électrocardiogrammes <i>in vivo</i> | 87 |
| 8. Analyse statistique..... | 91 |
| RESULTATS | 93 |
| DISCUSSION | 127 |
| Les différents modèles murins utilisés miment les pathologies cardiaques humaines | 130 |
| La tertiapine-Q corrige les dysfonctions sinusales et les troubles de la conduction . | 131 |
| La tertiapine-Q est active plus longtemps que l'atropine sur les dysfonctions sinusales et des troubles de la conduction. | 132 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 133 |
| BIBLIOGRAPHIE | 137 |
| ANNEXES | 151 |
| Annexe 1 | 153 |
| Annexe 2 | 158 |
| Résumé | 170 |

Index des illustrations

Figure 1 : Schéma du cœur avec le système de conduction cardiaque.

Figure 2 : Modèle du nœud sino-atrial de lapin superposé à un schéma du cœur.

Figure 3 : Morphologie des cellules isolées de SAN de souris.

Figure 4 : A : Schéma de cœur de lapin avec les jonctions AV, B : Morphologie des cellules du nœud auriculo-ventriculaire.

Figure 5 : Réseau His-Purkinje dans le ventricule droit et gauche du lapin.

Figure 6 : Morphologie des cellules des fibres de Purkinje de souris et des cellules ventriculaire de souris.

Figure 7 : Schéma de la structure des jonctions communicantes entre 2 cellules voisines.

Figure 8 : Représentation schématique de l'action des voies sympathique et parasympathique sur la cellule pacemaker.

Figure 9 : Régulation adrénérgique et cholinérgique de l'activité spontanée cardiaque.

Figure 10 : Représentation schématique d'une portion de cellule pacemaker du nœud sinusal (SAN) représentant les différents courants ioniques impliqués dans l'automatisme cardiaque.

Figure 11 : Représentation schématique du canal HCN.

Figure 12 : Expression de l'ARNm et de la protéine HCN4 au stade embryonnaire 10.5 jours.

Figure 13 : Représentation schématique d'un canal calcique avec la sous-unité principale α_1 et les sous-unités auxiliaires (β et $\alpha_2\text{-}\delta$).

Figure 14 : Famille de gène codant pour les VDCCs.

Figure 15 : Structure des canaux Na_v , avec la sous-unité α et les sous-unités β régulatrices.

Figure 16 : Arbre phylogénétique représentant les canaux sodiques voltages dépendants.

Figure 17 : Courants cardiaques rectificateurs retardés I_{Ks} , I_{Kr} .

Figure 18 : Structure tétramérique de Girk4-Girk1.

Figure 19 : Simulation numérique de l'activité spontanée d'une cellule pacemaker de souris, montrant le potentiel d'action (en mV) avec la dépolarisation diastolique (DD) et les courants ioniques contribuant à l'automatisme.

Figure 20 : Electrocardiogramme humain représentant une longue phase de fibrillation atriale.

Figure 21 : Maladie de l'oreillette montrant des changements de morphologie des ondes P.

Figure 22 : Courbe représentant l'incidence du nombre de cas annuels de SSS pour la population générale et par catégorie d'âge, pour les Etats-Unis, entre 2012 et 2060.

Figure 23 : Nombre d'implantation de pacemaker électronique en 2011 en Europe de l'Ouest.

Figure 24 : Nombre d'implantation de pacemaker en Europe de 2005 à 2011.

Figure 25 : Graphique représentant le pourcentage de complications liées à l'implantation d'un pacemaker électronique dans 16 hôpitaux.

Figure 26 : Structure primaire de la tertiapine-Q.

Figure 27 : Structure tertiaire de la tertiapine-Q.

Figure 28 : Electrocardiogrammes des souris *Wt*, *HCN4-AYA*, *Girk4* et *HCN4-AYA/Girk4^{-/-}*.

Figure 29: Trace électrocardiographique d'une souris sauvage (*WT* ; *+/+*) et d'une souris *Ca_v1.3^{-/-}*.

Figure 30 : A. Représentation topologique simplifiée de la sous-unité *Ca_v1.3*. B. Enregistrement de l'ECG d'un sujet sain et de 3 patients *SANDD* homozygotes pour la mutation de la sous-unité *Ca_v1.3*.

Figure 31 : Tracés électrocardiographiques de souris *WT*, *Ca_v1.3^{-/-}*, *Ca_v3.1^{-/-}* et *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}*.

Figure 32 : Représentation schématique de la topologie du canal *HCN4* avec ses 6 segments transmembranaires (S1 à S6), ses domaines N et C terminaux.

Figure 33 : Enregistrement des électrocardiogrammes *in vivo* par télémétrie.

Figure 34 : Electrocardiogramme (ECG) normal.

Figure 35 : Données électrocardiographiques des différents modèles murins utilisés dans cette étude en condition contrôle.

Figure 36 : Données électrocardiographiques des souris *Scn5a^{+/-}* en condition contrôle.

Figure 37 : Analyse de la conduction cardiaque des souris *WT* avant et après injection de NaCl.

Figure 38 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *WT*.

Figure 39 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Ca_v1.3^{-/-}*.

Figure 40 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}*.

Figure 41 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Ca_v3.1^{-/-}*.

Figure 42 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *HCN4-CNBD*.

Figure 43 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Girk4^{-/-}*.

Figure 44 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}*.

Figure 45 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris *Scn5a^{+/-}*.

Figure 46 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0.5 mg/Kg) et de tertiapine-Q (5 mg/Kg) chez les souris *WT*.

Figure 47 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0.5 mg/Kg) et de tertiapine-Q (5 mg/Kg) chez les souris *Ca_v1.3^{-/-}* (A) et les souris *Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}* (B).

Figure 48 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0.5 mg/Kg) et de tertiapine-Q (5 mg/Kg) chez les souris *Girk4*^{-/-} (A), les souris *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} (B) et les souris *Ca_v3.1*^{-/-} (C).

Figure 49 : Souris *Scn5a*^{+/-} : effet de l'injection d'atropine (0.5 mg/Kg) et comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0.5 mg/Kg) et de tertiapine-Q (5 mg/Kg).

Figure 50 : Durée d'action de la tertiapine-Q (0.1 ; 1 et 5 mg/Kg) et de l'atropine (0.5 mg/Kg) chez les souris *WT* (A), *Ca_v1.3*^{-/-} (B), *Ca_v1.3*^{-/-}/*Ca_v3.1*^{-/-} (C), *HCN4-CNBD* (D), *Ca_v3.1*^{-/-} (E), *Girk4*^{-/-} (F) et *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} (G).

Figure 51 : Durée d'action de la tertiapine-Q (0.1 ; 1 et 5 mg/Kg) et de l'atropine (0.5 mg/Kg) chez les souris *Scn5a*^{+/-}.

Figure 52 : Origines multifactorielles provoquant le SSS.

Index des tableaux

Tableau 1 : Les différents sous-types de canaux calcique activés par le voltage et leur localisation tissu spécifique.

Tableau 2 : Les différents sous-types de canaux sodiques activés par le voltage et leur localisation tissu spécifique.

Tableau 3 : Causes du Sick Sinus Syndrome.

Annexe 1 : Tables des différents paramètres mesurés selon les génotypes.

Liste des abréviations

AC : Adénylate Cyclase

Ach : Acétylcholine

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

BAV : Bloc Auriculo-Ventriculaire

Bpm : Battement par minute

CDI : Inactivation Dépendante du Calcium

CDF : Facilitation Dépendante du Calcium

CHB : Bloc cardiaque congénital (Congenital Heart Block)

CNBD : Domaine de liaison de l'AMPc (Cyclic Nucleotide-Binding Domain)

CNG : Canal contrôlé par les nucleotides cycliques (Cyclic Nucleotide Gated channel)

CT : Crista Terminalis

Cx : Connexine

DD : Dépolarisation Diastolique

DHP : Dihydropyridine

DOX : Doxycycline

ECG : Electrocardiogramme

ESV : Extrasystole Ventriculaire

FA : Fibrillation Atriale

FC : Fréquence Cardiaque

FP : Fibre de Purkinje

GIRK : Canal potassique activé par la protéine G (G protein-activated Inward-Rectifying potassium channel)

HCN : Canal activé par l'hyperpolarisation contrôlé par les nucleotides cycmliques (Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide gated channel)

HR : Fréquence cardiaque (Heart Rate)

ICV : Veine cave inférieure

I_{CaL} : Courant Calcique de type L

I_{CaT} : Courant Calcique de type T

I_{Kr} : Courant Rectifiant Rapide

I_{Ks} : Courant Rectifiant lent

I_{ST} : Courant entrant Soutenu (courant soutenu de Na)

I_f : courant *funny* (courant activé par l'hyperpolarisation)

$I_{K_{ACh}}$: Courant potassique activé par l'acétylcholine

IP : Intraperitonéale

KO : KnockOut

LTCC : Canal Calcique de type L

M₂ : Récepteur Muscarinique de type 2

NAV: Nœud Auriculo-Ventriculaire

NCX : Echangeur Na⁺/Ca²⁺

PA : Potentiel d'Action

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5 Biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5 Triphosphate

PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SAN : Nœud sinusal (SinoAtrial Node)

SANDD : Dysfonction du nœud sino-atrial et surdité (Sinoatrial Node Dysfunction and Deafness)

SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase

SNA : Système Nerveux Autonome

SSS : Maladie rythmique de l'oreillette (Sick Sinus Syndrome)

TTCC : Canal Calcique de type T

TTX : Tétrodotoxine

VDCC : Canal Calcique voltage dépendant

VDKC : Canal potassique voltage dépendant

WT : Souris sauvage (Wild Type)

Valorisation des travaux de recherche

Les travaux effectués au cours de ces 3 années et demie de thèse font l'objet d'un article qui sera soumis à publication. Les résultats ont également été présentés lors de congrès ou de colloques scientifiques, sous forme de présentations orales et/ou de posters.

De plus, plusieurs formations scientifiques et complémentaires ont été réalisées pendant ces années.

Publications :

- Etude principale de la thèse (1^{er} auteur)

Chung You Chong A, Bidaud I, Carcouet A, De Waard S, Ronjat M, De Waard M, Vincent A, Charpentier F, Mangoni ME, Mesirca P. *Blockade of G protein-activated K⁺ (Girk4) channels by the bee venom peptide tertiapin-Q normalizes heart rhythm in mice models of congenital sino-atrial bradycardia and atrioventricular conduction dysfunction* (en cours de rédaction)

- Article de collaboration

Pietro Mesirca, Isabelle Bidaud, François Briec, Stéphane Evain, Angelo G. Torrente, Khai Le Quang, Anne-Laure Leoni, Matthias Baudot, Laurine Marger, **Antony Chung You Chong**, Joël Nargeot, Jörg Striessnig, Kevin Wickman, Flavien Charpentier, Matteo E. Mangoni. *G-protein-gated I_{KACH} channels as therapeutic targets for treatment of sick-sinus syndrome and heart block (PNAS, 2016)*

Communications :

❖ Orales :

Inhibition of I_{KACH} current rescues sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital sino-atrial dysfunction

- Colloque du printemps de la cardiologie, Nantes, 06 et 07 Avril 2017
- Colloque patch club, Montpellier, 30 Juin 2017
- Colloque patch club, Montpellier, 08 Juin 2018
- Colloque canaux ionique, Sète, 09 au 12 Septembre 2018

❖ Posters :

Inhibition of I_{KACH} current rescues sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital sino-atrial dysfunction

- Colloque du printemps de la cardiologie, Nantes, 06 et 07 Avril 2017
- Journée de l'école doctorale CBS2, Montpellier 24 Mai 2017
- Colloque canaux ionique, Sète, 09 au 12 Septembre 2017
- Colloque du LabEx, ICST, 29 novembre au 1^{er} Décembre 2017
- Colloque du Printemps de la Cardiologie, Montpellier, 04 au 06 Avril 2018

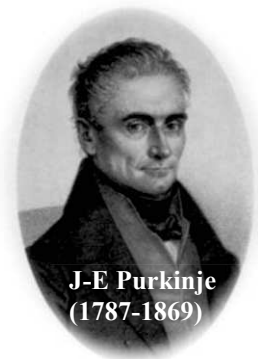
Formations :

- 2016 : Expérimentation animale, niveau 1; RAM Montpellier (70h)
- 2018 : Ecole d'Electrophysiologie de Montpellier
 - Module théorique (70h)
 - Module pratique (25h)
- 2018 : Construire et exploiter des tableaux de calculs et des graphiques
- 2017-2018 : Développement personnel (28h)
- 2019 : Management et conduite de projet (70h en cours)
- 2019 : Anglais stage intensif : (42h en cours)

INTRODUCTION

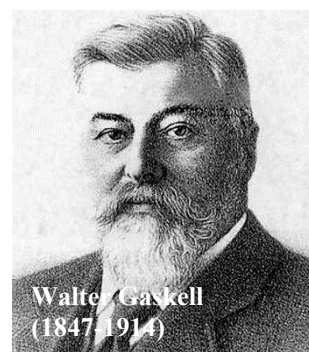
1. Notions historiques sur la découverte du système de conduction cardiaque

Comment le cœur bat-il ? Cette question cruciale a animé les recherches des physiologistes pendant des siècles. Dès le deuxième siècle, Claudius Galen a observé qu'un cœur, extrait de la cage thoracique, continue de battre pendant un certain temps. Ceci indiquait déjà que le cœur n'a pas besoin des nerfs pour assurer sa fonction contractile. Il a fallu attendre le XIX^{ème} siècle et les découvertes du site d'origine de l'impulsion électrique et du réseau de conduction pour comprendre et expliquer les battements cardiaques. Après la découverte des fibres de Purkinje en 1839, ce sont successivement le faisceau de His (1893), les branches (1904), puis le nœud auriculo-ventriculaire (1906) et le nœud sinusal (1907) qui sont découverts (Silverman et al., 2006).



En 1839, Jan Evangelista Purkinje découvre un réseau de fibres plates et gélatineuses dans le sous-endocarde ventriculaire du cœur de mouton. Après avoir pensé qu'il s'agissait de fibres cartilagineuses, il a ensuite estimé que ces fibres étaient de nature musculaire. Il faudra attendre les travaux de Tawara, en 1906, pour comprendre le rôle de ces fibres dans la conduction cardiaque distale (Tawara, 1906).

Sur un cœur de tortue battant lentement, Walter Gaskell a mis en évidence que la conduction du battement cardiaque se déroule de manière coordonnée, comme une onde musculaire péristaltique allant du sinus veineux vers le sinus auriculaire puis vers le ventricule. Il a noté que certaines régions cardiaques étaient plus susceptibles que d'autres à générer de la rythmicité. Il a défini le sinus veineux comme étant le



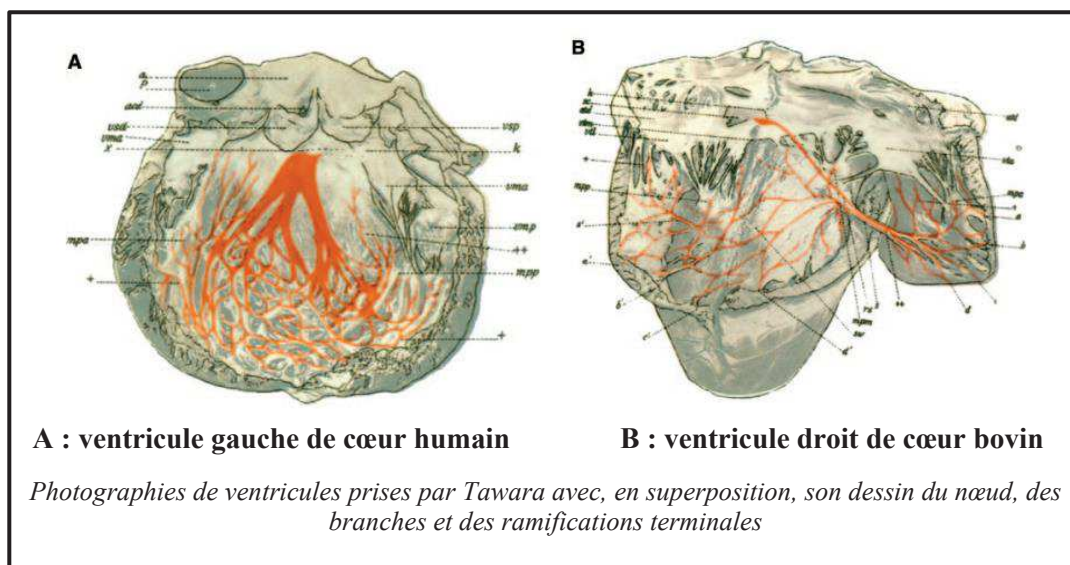
générateur dominant de l'automaticité. Ces observations soutiennent l'origine myogénique et la propagation de l'impulsion cardiaque. En effectuant une ligature au niveau du sillon auriculo-ventriculaire et en coupant diverses portions atriales, Gaskell a induit des BAVs de degrés variés (1882-83). Il a conclu que la propagation de l'impulsion ralentit au niveau de la jonction entre les oreillettes et les ventricules. En 1886, dans des cœurs de grenouille et de tortue, il a démontré que la rupture ciblée des connections musculaires, formant un anneau, bloque la contraction coordonnée des oreillettes et des ventricules (Gaskell, 1882, 1883). Ces travaux démontrent, pour la première fois, l'existence de fibres musculaires spécialisées reliant les oreillettes aux ventricules.

Wilhelm His est reconnu pour sa découverte du réseau de conduction entre le nœud auriculo-ventriculaire et les branches (1893). En étudiant l'effet de sections cardiaques réalisées à différents stades du développement embryonnaire, His a démontré que les battements du cœur apparaissent en amont du développement des nerfs et des ganglions spinaux. Ces observations soutiennent la théorie « myogénique » qui défend l'absence du rôle du système nerveux dans la genèse des contractions cardiaques ; par opposition à la théorie « neurogénique » encore en cours à l'époque. Se basant sur les travaux de Gaskell et en effectuant une dissection minutieuse, His identifie une structure interrompant l'anneau fibreux séparant les oreillettes des ventricules. Il postule, sans d'abord le prouver, que cette structure sert à conduire l'influx des oreillettes vers les ventricules. Il découvre ainsi le faisceau de His. Sur des cœurs de lapin, il démontrera que la section de ce faisceau induit des contractions asynchrones entre les oreillettes et les ventricules.



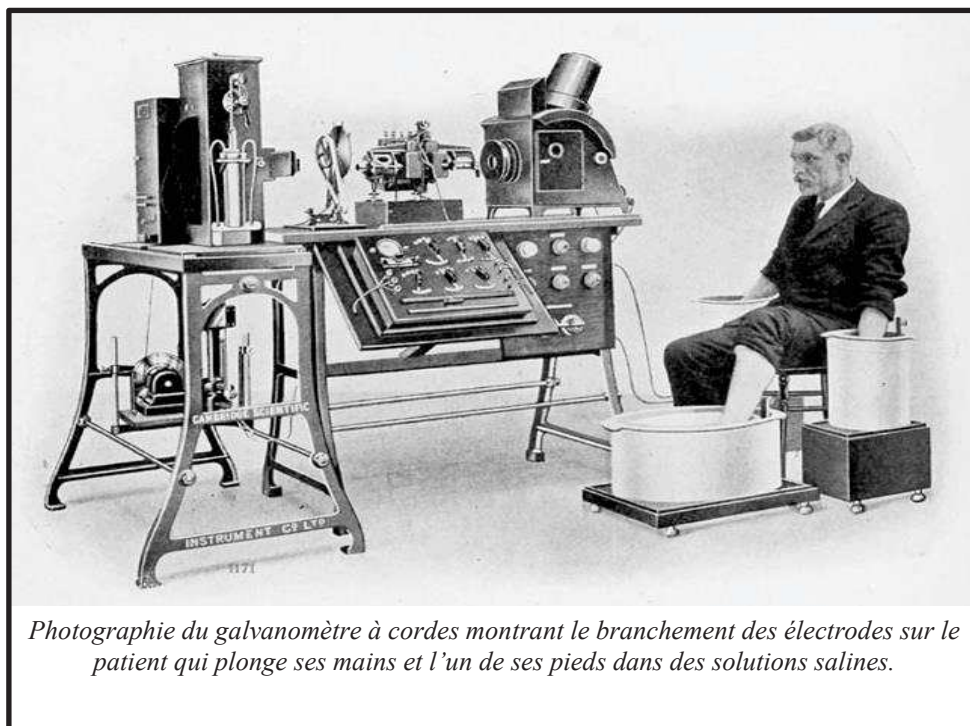
En disséquant 150 cœurs, Sunao Tawara individualise, à la base du septum atrial, une structure formée par des cellules emmêlées « comme dans un nœud ». Il met en évidence le nœud auriculo-ventriculaire. Plus distalement, il observe que le faisceau de His se prolonge et se divise en deux branches, droite et gauche. En collaboration avec Aschoff, il réalise rapidement que ces fibres particulières pourraient être les fibres gélatineuses

découvertes et décrites par Purkinje, 58 ans plus tôt. Il confirme cette hypothèse en étudiant des cœurs de moutons et d'humains. Le génie de Tawara a été de comprendre la fonction des cellules de Purkinje et d'identifier le réseau électrique du système de conduction atrioventriculaire. Pour Tawara, le système de conduction a pour origine le nœud auriculoventriculaire, il pénètre ensuite la portion fibro-cartilagineuse du septum, se poursuit par le faisceau de His qui se divise en 2 branches pour se terminer au niveau des ramifications terminales des fibres de Purkinje (Tawara, 1906). Les travaux de Tawara ont contribué à une meilleure compréhension de la physiologie cardiaque et de son contrôle électrique.



La découverte des bases anatomiques à l'origine de l'impulsion électrique contrôlant le rythme cardiaque chez les mammifères est attribuée à Arthur Keith et son étudiant Martin Flack. En 1906 en étudiant un cœur de taupe, ils découvrent une structure particulière et différente des cellules musculaires environnantes au niveau de l'oreillette droite, à la jonction de la veine cave supérieure. Après des observations plus fines, Keith et Flack mettent en évidence que ces cellules ressemblent à celles décrites par Tawara dans le nœud atrioventriculaire. De plus, ils démontrent que ces cellules spécifiques sont localisées au niveau de la région initiale de la contraction cardiaque décrite par Gaskell. Leurs découvertes ont été publiées en 1907 dans le *Journal of Anatomy* (Keith and Flack, 1907). Le nœud sino-auriculaire de Keith et Flack constitue la zone pacemaker du cœur.

Au fil des années, diverses avancées ont permis de compléter ces travaux sur le site d'origine de l'impulsion électrique et de sa conduction. En 1901, W. Einthoven a développé un galvanomètre à corde permettant de mesurer l'électricité cardiaque.



Entre 1910 et 1915, T. Lewis a utilisé le système d'électrocardiogramme d'Einthoven pour vérifier la localisation du nœud sinusal par la « négativité électrique primaire ». Il a tracé son chemin excitateur à travers les oreillettes et les ventricules, fournissant ainsi la confirmation de ce système électrique complexe.

2. Automatisation cardiaque et système de conduction

Chez les mammifères, l'activité électrique cardiaque est engendrée par une population de myocytes spécialisés, capables de fournir des oscillations électriques périodiques spontanées de leur potentiel membranaire. Ces myocytes sont appelés cellules « pacemakers » (Mangoni and Nargeot, 2008). Les cellules pacemakers sont localisées dans le tissu nodal. Ce tissu spécifique intrapariétal donne naissance aux impulsions électriques puis les conduit à grande vitesse vers les cellules myocardiques, engendrant ainsi les contractions cardiaques.

Le tissu nodal est constitué :

- du nœud sinusal (SAN) (aussi appelé nœud de Keith et Flack) situé dans l'oreillette droite près de l'abouchement de la veine cave supérieure ;
- du nœud auriculo-ventriculaire (NAV) (également nommé nœud d'Achoff-Tawara) localisé dans le septum interventriculaire à la jonction de l'oreillette droite avec le ventricule droit ;
- du réseau des fibres de Purkinje dont les ramifications vont au contact du myocarde ventriculaire.

Les cellules pacemakers ont pour caractéristique principale d'avoir un potentiel de membrane instable qui, lorsqu'il atteint une certaine valeur, déclenche un potentiel d'action (PA). Les cellules du SAN sont celles qui ont la fréquence de décharge la plus rapide. En condition physiologique normale, ce sont elles qui imposent leur rythme au cœur. Les cellules du SAN reçoivent une importante innervation sympathique et parasympathique dont l'équilibre règle la fréquence cardiaque. Nous reparlerons de cet aspect ultérieurement.

Du fait de leur automaticité intrinsèque plus rapide, les cellules pacemakers du SAN inhibent l'activité pacemaker du NAV et du réseau de fibres de Purkinje. En cas de dysfonctionnement du SAN, le NAV peut prendre le relais comme étant le centre du pacemaker dominant. Dans des conditions de bloc complet de la conduction auriculo-ventriculaire, appelé en clinique « bloc de troisième degré », les fibres de Purkinje sont capables d'engendrer un rythme viable, même à des fréquences relativement faibles (Dobrzynski et al., 2013; James, 2003).

Dans les voies de conduction auriculaires, les potentiels d'action se propagent de proche en proche dans le myocarde des oreillettes droite et gauche provoquant leur contraction et l'expulsion du sang vers les ventricules. Les potentiels d'action gagnent ensuite le nœud auriculo-ventriculaire, qui constitue le lieu de passage obligé des potentiels d'action entre oreillettes et ventricules. Le rôle du NAV est de filtrer les impulsions électriques qui lui parviennent, de les éliminer en partie, de les coordonner et d'en faire un influx électrique homogène transmis au faisceau de His jusqu'à l'apex du cœur (**Figure 1**). La systole ventriculaire se produit alors, le sang des ventricules est chassé vers l'artère pulmonaire et l'aorte.

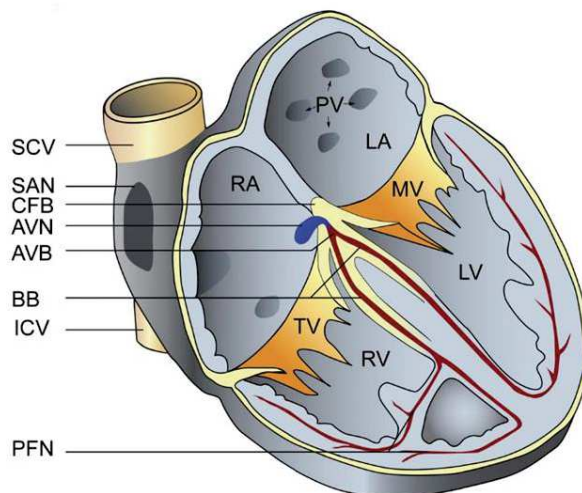


Figure 1 : Schéma du cœur avec le système de conduction cardiaque (en rouge). Le nœud sino-atrial (SAN) se situe à l'abouchement de la veine cave supérieure (SCV) dans l'oreillette droite (RA). Le nœud auriculo-ventriculaire (NAV) est délimité par la veine cave inférieure (ICV), le corps fibreux central (CFB) et la valve tricuspide (TV). Le nœud auriculo-ventriculaire se prolonge par le faisceau de His (AVB) qui se divise en branches (BB), droite et gauche, se ramifiant ensuite pour donner les fibres de réseau de Purkinje (PFN). Les autres abréviations sont : oreillette gauche (LA), les veines pulmonaire (PV), la valve mitrale (MV), ventricule droit (RV) ventricule gauche (LV). D'après (Mangoni and Nargeot, 2008)

2.1 Le nœud sinusal (SAN)

Le tissu pacemaker du nœud sinusal (SAN), est localisé entre la veine cave supérieure et la veine cave inférieure (Boyett et al., 2000). Il s'étend vers la face endocardique de la *crista terminalis* (**Figure 2**).

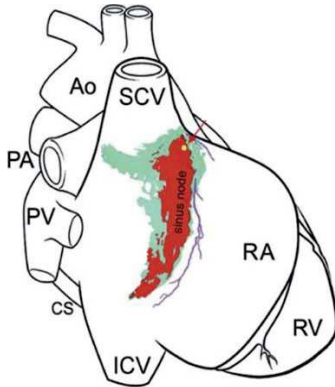


Figure 2 : Modèle du nœud sino-atrial de lapin superposé à un schéma du cœur (vue dorsale) ; En rouge, les cellules centrales du nœud sinusal, en bleu, le tissu périphérique du nœud sinusal. D'après (Dobrzynski et al., 2005). Abréviations : Ao : aorte, CS : sinus coronarien, ICV : veine cave inférieure, PA : artère pulmonaire, PV : veine pulmonaire, RA : oreillette droite, RV : ventricule droit, SCV : veine cave supérieure

Dans le SAN, trois types de cellules, aux morphologies distinctes, coexistent. On distingue les cellules en fuseau, les cellules en forme d'araignée et les cellules allongées (**Figure 3**). Dans le SAN de lapin et de souris, les cellules en fuseau sont généralement plus petites que les cellules allongées et celles en forme d'araignée. Le cytoplasme des cellules en fuseau apparaît transparent et pauvre en myofilaments. Le cytoplasme des cellules allongées est plus sombre que celui des cellules en forme d'araignée. Ceci peut résulter de la plus forte densité en myofilaments contenus dans ces cellules allongées comparativement aux cellules en forme d'araignée. Le cytoplasme des cellules en forme d'araignée est ramifié. D'après Toyoda et collaborateurs (Toyoda et al., 2017), les cellules en fuseau et en araignée constituent la morphologie prédominante des cellules pacemakers. Dans le SAN de lapin, les cellules en fuseau sont considérées comme les cellules pacemakers primaires (Boyett et al., 2000). Ces cellules semblent concentrées au centre du SAN alors que les cellules allongées, plus grandes, sont localisées vers périphérie du nœud sinusal (Honjo et al., 1996). Cependant, dans le SAN de lapin, de petits groupements de cellules en fuseau et allongées sont observées (Verheijck et al., 1998).

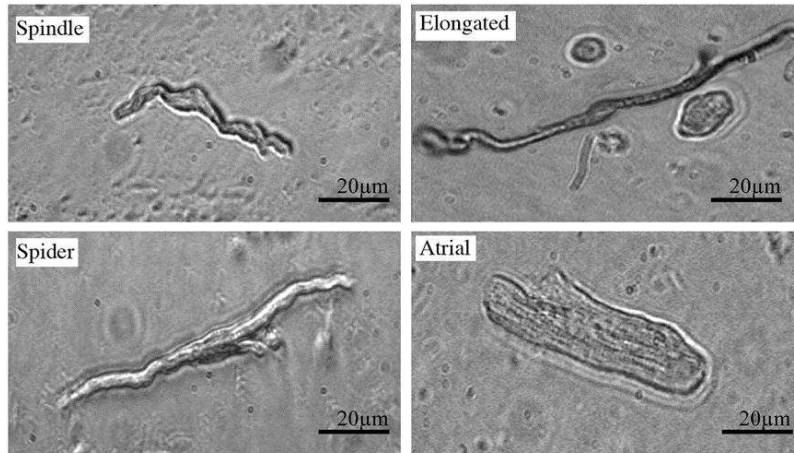


Figure 3 : Morphologie des cellules isolées de SAN de souris. *Spindle* : cellule en fuseau, *Elongated* : cellule en forme d'araignée, *Spider* : cellule en forme allongée, *Atrial* : cellule atriale. De (Mangoni and Nargeot, 2008)

En plus des cellules pacemakers, le SAN contient également des cellules atriales, des fibroblastes et des adipocytes (Dobrzynski et al., 2005). La région sinusale est relativement riche en collagène. Ce dernier n'a pas d'effet sur les propriétés de conduction du SAN. Il faut noter qu'au cours du vieillissement, la taille et la position du SAN ne changent pas mais que sa structure évolue. Un remodelage est effectivement observé, suite à l'enrichissement en collagène (Alings et al., 1995).

2.2 Le nœud auriculo-ventriculaire

Le nœud auriculo-ventriculaire fait partie de l'axe de conduction auriculo-ventriculaire. Il est localisé au niveau de la partie inférieure du septum inter-auriculaire, entre l'abouchement du sinus coronaire et l'insertion de la valve septale de la tricuspide (**Figure 4A**). Sa fonction principale est de conduire le potentiel d'action des oreillettes vers les ventricules. C'est l'unique point de passage de l'impulsion électrique entre les oreillettes et les ventricules. Le NAV doit conduire lentement le potentiel d'action afin de permettre un délai entre la systole atriale et ventriculaire (Chandler et al., 2009) et permettre ainsi une bonne coordination de contraction entre les oreillettes et les ventricules. Le NAV a un aspect fonctionnel permettant de bloquer les impulsions électriques anarchiques des oreillettes vers les ventricules ce qui protège les ventricules d'un rythme trop rapide. Il sert donc de filtre électrique. Le NAV peut également servir

de pacemaker cardiaque quand les cellules du nœud sinusal sont défailiantes. Les cellules du NAV sont de forme allongée et fusiforme (**Figure 4B**) (Hancox and Levi, 1994; Marger et al., 2007; Marger et al., 2011b).

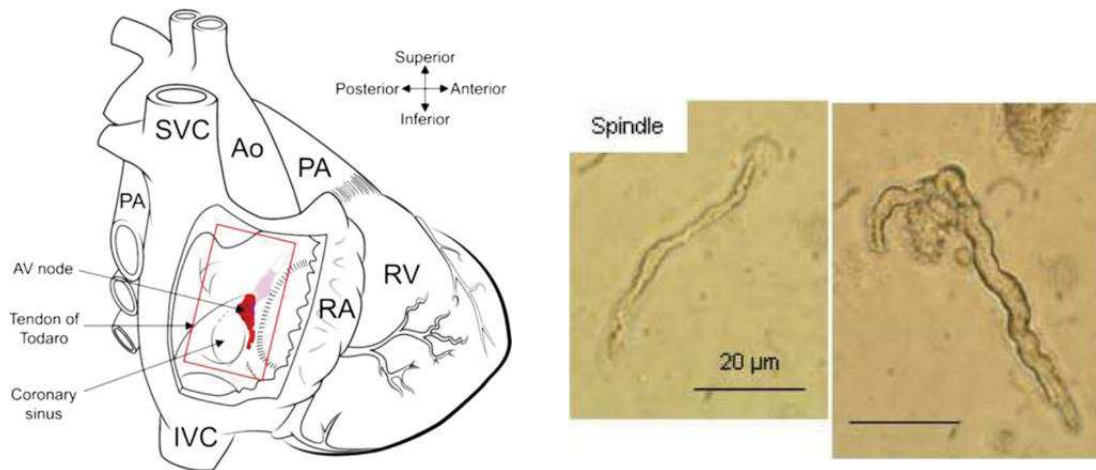


Figure 4 : A : Schéma de cœur de lapin avec les jonctions AV. Ce schéma montre la localisation du NAV d'après (Li et al., 2006) Abréviations : Ao : aorte, FO : fosse ovale, IVC : veine cave inférieure, PA : artère pulmonaire, RA : oreillette droite, RV : ventricule droit, SVC : veine cave supérieure. D'après (Dobrzynski et al., 2013) **B : Morphologie des cellules du nœud auriculo-ventriculaire.**

2.3 Faisceau de His et fibres de Purkinje

Le faisceau de His et les fibres de Purkinje constituent les tissus de conduction ventriculaires. Le faisceau de His est localisé dans la partie haute du septum interventriculaire.

Le tronc du faisceau de His se divise en deux branches, une droite pour le ventricule droit et une qui naît du tronc et qui chemine sous l'endocarde du ventricule gauche pour se ramifier en plusieurs rameaux qui parcourent toute la paroi du ventricule gauche jusqu'à la branche gauche du faisceau de His. Le réseau terminal de la branche droite se nomme réseau de Purkinje.

La portion ventriculaire du système de conduction cardiaque qui part du NAV jusqu'au myocarde contractile ventriculaire est importante et vitale. En effet, la structure de ce système assure l'activation simultanée du myocarde ventriculaire pour avoir l'activité de pompage du sang la plus efficace possible.

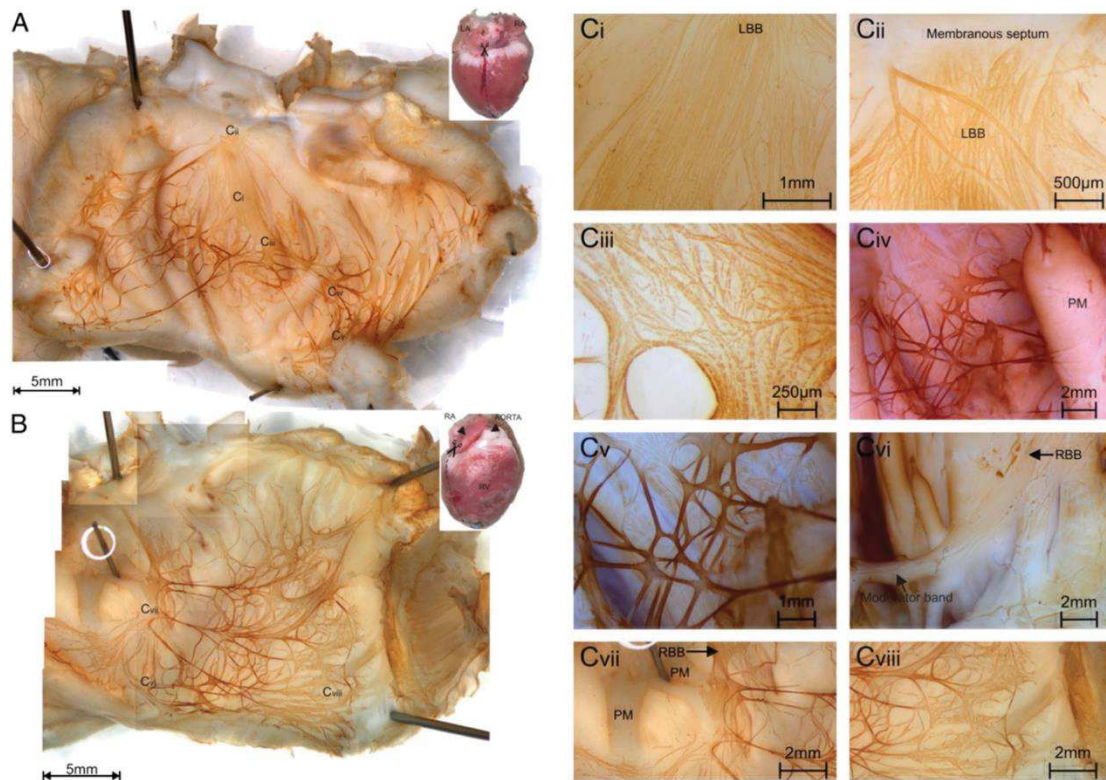


Figure 5 : Réseau His-Purkinje dans le ventricule droit et gauche du lapin. A. Marquage immunoenzymatique des neurofilaments sur la surface endocardiale de l'oreillette gauche. B. Marquage immunoenzymatique des neurofilaments sur la surface endocardiale de l'oreillette droite. Ci : Grossissement de l'origine de la branche du faisceau gauche (LBB) dans le septum membraneux près de la racine de l'aorte. Cii : Faisceau de His antérieur gauche. Ciii : division du faisceau de His postérieur gauche formant les fibres de Purkinje. Ciiii : Faisceau de His gauche et fibres de Purkinje connectés aux muscles papillaires (PM). Cv : fibres de Purkinje dans le ventricule gauche. Cv : Faisceau de His droit. Cvii : Faisceau de His gauche allant dans la surface septale croisant la chambre ventriculaire. Cviii : réseau de fibres de Purkinje périphérique dans le ventricule droit. De (Dobrzynski et al., 2013).

- Faisceau de His

Le faisceau de His est le composant isolé de l'axe de la conduction auriculo-ventriculaire (Figure 5). Ce faisceau est reconnaissable anatomiquement quand il se retrouve isolé. Il est composé d'une branche gauche et d'une branche droite asymétrique (**Figure 1**).

- Réseau de Purkinje

Le réseau de Purkinje se situe au niveau de la terminaison du faisceau de His (**Figure 5**).

Les cellules du réseau His-Purkinje ont principalement une morphologie dite « rod-shaped » ; elles sont plus grandes que les cellules du SAN et NAV mais plus petites que les cellules ventriculaires (**Figure 6**).

La principale fonction du réseau His-Purkinje est de conduire rapidement le potentiel d'action entièrement dans le ventricule afin d'assurer la contraction du muscle ventriculaire. La seconde fonction de ce réseau est d'agir comme le pacemaker ventriculaire en cas de bloc cardiaque.

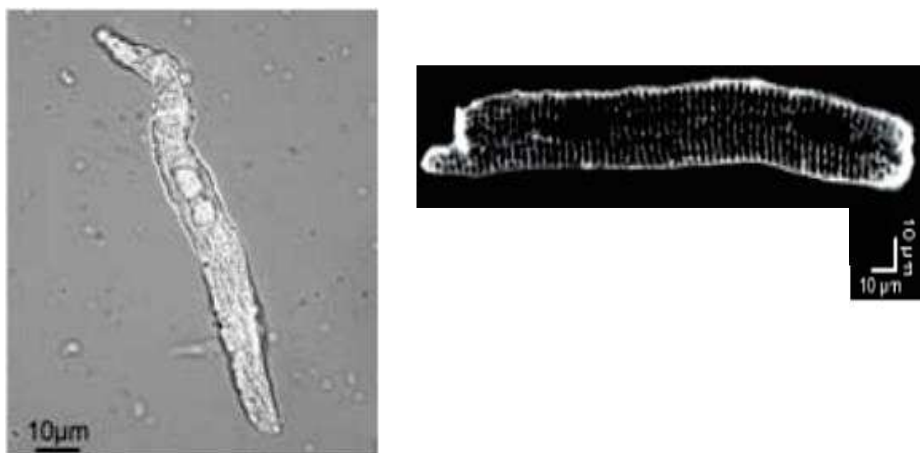


Figure 6 : Photo de gauche : *Morphologie des cellules des fibres de Purkinje de souris* (Miquerol et al., 2004). Photo de droite : *Morphologie des cellules ventriculaire de souris* (Hamaguchi et al., 2013)

2.4 Communication intercellulaire au sein du tissu nodal : rôle des connexines

Les cellules cardiaques communiquent entre elles grâce à des jonctions communicantes appelées, en anglais, gap junction. Ces jonctions communicantes mettent en relation le cytoplasme de deux cellules voisines. Elles constituent un canal traversant les deux membranes cellulaires. Chaque canal est constitué de deux connexons. Un connexon est lui-même constitué de 6 connexines (Cx). Ces Cx déterminent les propriétés de conduction dans les différents tissus cardiaques (Gros and Jongsma, 1996) (**Figure 7**).

Ces jonctions communicantes interviennent dans la propagation de l'influx électrique dans le cœur (couplage électrique). Elles jouent, également, un rôle crucial dans la vitesse de conduction de l'influx électrique (Rohr, 2004).

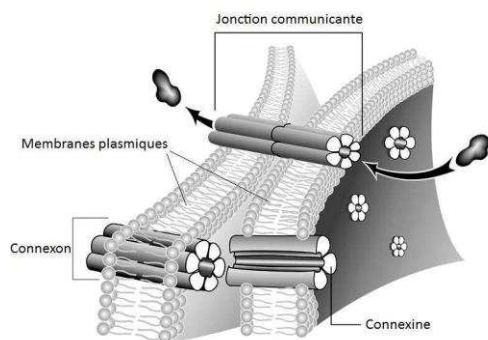


Figure 7 : Schéma de la structure des jonctions communicantes entre 2 cellules voisines.

Les connexines déterminent les propriétés de conduction dans les différents tissus cardiaques (Gros and Jongsma, 1996). Les trois connexines principalement exprimées dans le cœur sont les connexines 40, 43 et 45.

- La Cx43 constitue, de loin, l'isoforme cardiaque majoritaire. Chez l'homme et le bovin, la Cx43 est présente dans les myocytes cardiaques des oreillettes et des ventricules ainsi que dans les myocytes conducteurs du faisceau de His et du réseau de Purkinje. Elle est faiblement observée dans le SAN et le NAV (Davis et al., 1995; Moorman et al., 1998). La connexine 43 serait le principal déterminant de la conduction intercellulaire dans les ventricules.

- La Cx45 est exprimée majoritairement dans le SAN, le NAV, le faisceau de His. Son rôle est essentiel pour coordonner la synchronisation des activités contractiles des cardiomyocytes embryonnaires et pour la progression normale de la cardiogenèse.
- La Cx40 est fortement exprimée dans les myocytes atriaux, le NAV, le faisceau de His et le système de conduction ventriculaire (Davis et al., 1995; Delorme et al., 1997; Gros and Jongsma, 1996; Miquerol et al., 2004; van Veen et al., 2005). Elle contribue très significativement à la propagation de l'activité électrique dans les oreillettes et le système de conduction.

Dans le SAN et la zone paranodale, les jonctions communicantes sont petites et peu nombreuses comparées aux autres tissus cardiaques. Il y a donc un faible couplage électrique dans le SAN. Le nœud sinusal est protégé de l'influence hyperpolarisante de l'oreillette droite grâce à l'expression de la connexine 45 et qui évite un dysfonctionnement du rythme cardiaque (Dobrzynski et al., 2005).

Dans le NAV, la faible vitesse de conduction est due à un faible degré de couplage électrique entre les cellules qui les constituent. Les Cx43 et Cx40 y sont faiblement exprimées. De plus, la Cx40 à haute conductance n'est pas exprimée dans la partie compacte du NAV (Miquerol et al., 2004; Pennisi et al., 2002; van Kempen et al., 2003). En revanche, la Cx45 est exprimée abondamment dans le NAV. Cela favorise une faible vitesse de conduction. L'absence de Cx43 est l'une des raisons du ralentissement de la conduction du potentiel d'action par le NAV.

La principale fonction du réseau His-Purkinje est de conduire rapidement le potentiel d'action entièrement dans le ventricule afin d'assurer la contraction du muscle ventriculaire. Cela est rendu possible par l'expression massive de connexines et plus particulièrement les Cx40 et Cx45 (Coppen et al., 1998).

Les connexines peuvent avoir un rôle dans le développement de certaines pathologies. Ainsi, des variations dans l'expression des Cx40 et Cx43 ont été observées chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire ou d'insuffisance cardiaque.

Des modifications du patron d'expression de la Cx43 ont été retrouvées dans l'hypertrophie cardiaque et l'infarctus du myocarde (Severs et al., 2004). Un déficit très important en Cx43 perturbe la vitesse de conduction et entraîne des arythmies ventriculaires fatales (Kalcheva et al., 2007).

2.5 Régulation par le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA) découvert dans les années 1830 et 1840, est considéré comme le régulateur principal de l'automatisme cardiaque. Dans le cœur adulte, la branche sympathique du système nerveux autonome accélère le rythme cardiaque, tandis que la branche parasympathique le ralentit. Le contrôle automatique de l'activité du stimulateur est généré par la balance entre ces deux branches (Mangoni and Nargeot, 2008). Le rapport entre ces deux contributions varie selon les espèces (Ophthof, 2000), avec un tonus sympathique prédominant chez les petits mammifères, tandis que les grands mammifères sont sous un contrôle vagal prédominant. Par exemple, chez la souris, la fréquence cardiaque intrinsèque est nettement inférieure à la fréquence cardiaque *in vivo*. Inversement, le bloc pharmacologique du système nerveux parasympathique chez l'homme accélère la fréquence cardiaque basale.

2.5.1 Le système nerveux sympathique

L'activation du système nerveux sympathique est associée à l'action : son rôle est de mettre l'organisme en état d'alerte et de le préparer à une activité accrue. L'effet du tonus sympathique s'exerce par la libération de noradrénaline qui active les récepteurs β -adrénergiques dans le nœud sinusal. Le résultat est l'accélération du rythme cardiaque. Les récepteurs β -adrénergiques sont des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés *via* une protéine G_s à une enzyme de la membrane plasmique nommée adénylate cyclase (AC). La stimulation des récepteurs β induit donc la formation d'AMP cyclique (AMPC) (**Figure 8**). L'AMPC est l'initiateur de toute une cascade de signalisation incluant l'activation de la protéine kinase A et d'autres partenaires régulés par l'AMPC, tels que les canaux HCN4 et $Ca_v1.3$. Cela se traduit par l'augmentation de la pente de la

dépolarisation diastolique du nœud sinusal et une accélération conséquente de la fréquence cardiaque (**Figure 9**).

2.5.2 Le système nerveux parasympathique

L'activation du système nerveux parasympathique, à l'inverse du système nerveux sympathique, correspond à une réponse de relaxation. Ses médiateurs chimiques, l'acétylcholine (ACh) et l'adénosine (Ado), utilisent la même voie de signalisation. L'adénosine active le récepteur Adénosine 1 (A₁) et l'ACh stimule le récepteur muscarinique de type 2 (M₂), activant la protéine G_i (protéine inhibitrice de l'AC) (**Figure 8**). La protéine G est constituée de sous-unités α et $\beta\gamma$. La sous-unité $\beta\gamma$ active directement les canaux Girk4-Girk1. La sous-unité α quant à elle, régule négativement l'adénylate cyclase. La conséquence de cette inhibition est une diminution de la production d'AMPc, ce qui inverse le processus de signalisation impliqué dans la stimulation sympathique du cœur

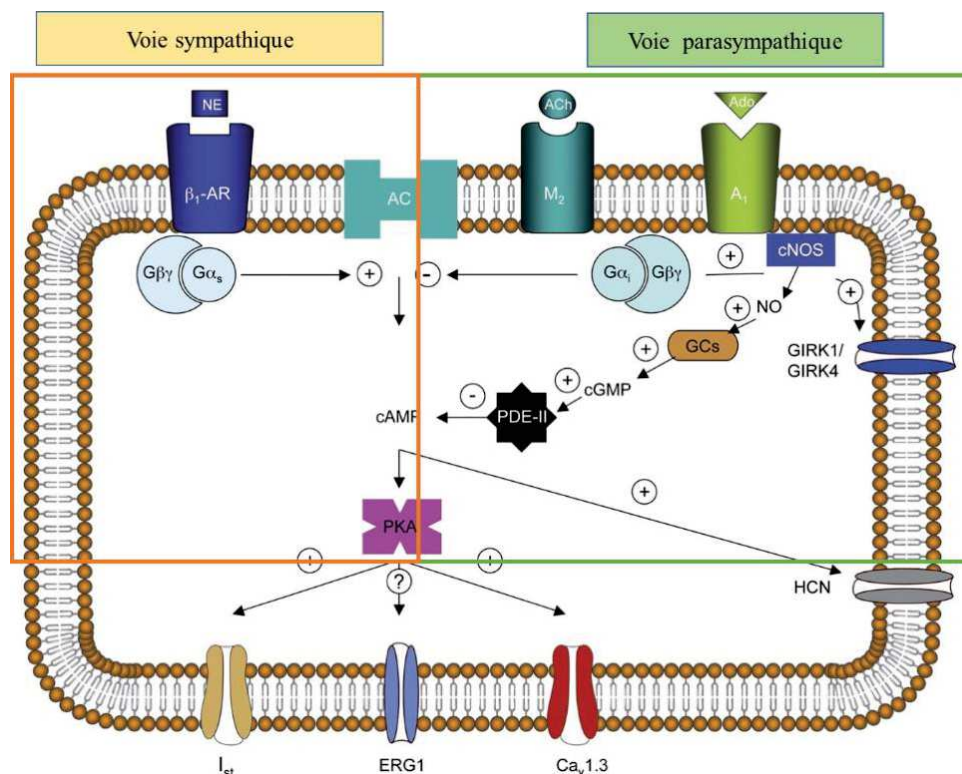


Figure 8 : Représentation schématique de l'action des voies sympathique et parasympathique sur la cellule pacemaker. D'après (Mangoni et Nargeot, 2008).

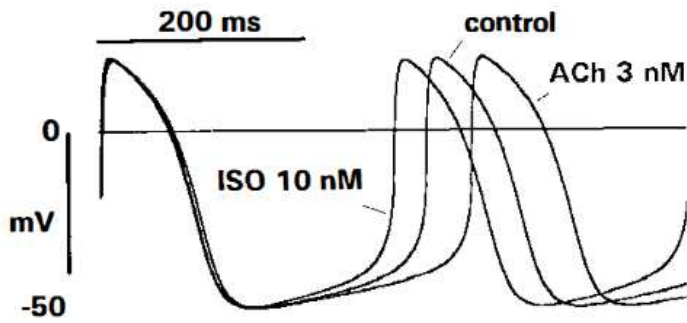


Figure 9 :
Régulation
adrénergique et
cholinergique de
l'activité spontanée
cardiaque.

Accélération de l'activité spontanée induite par l'isoprénaline (10 nM ; agoniste des récepteurs β -adrénergiques) et ralentissement induit par l'acétylcholine (3 nM dans le nœud sinusal). D'après (DiFrancesco, 1993).

3. La cellule pacemaker

3.1 Description des courants ioniques impliqués dans la génération du rythme

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires capables de changer de conformation et d'osciller entre des états fermés, inactivés et ouverts, en fonction du potentiel de membrane et/ou des ligands spécifiques. Ils facilitent et contrôlent le passage des ions à travers la membrane lipidique et constituent un système de transport macromoléculaire spécifique (**Figure 10**). Les canaux ioniques constituent un passage favorable pour la diffusion rapide et passive des ions en fonction de leur potentiel électrochimique, générant ainsi le potentiel d'action cardiaque (Noble, 1960, 1966).

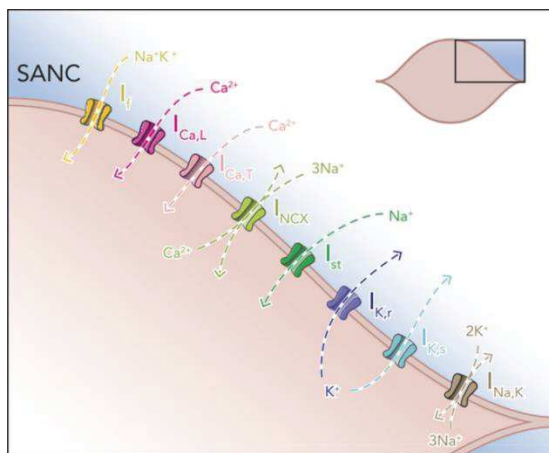


Figure 10 : Représentation schématique d'une portion de cellule pacemaker du SAN représentant les différents courants ioniques impliqués dans l'automatisme cardiaque. D'après (Monfredi et al., 2013).

3.1.1 Courant I_f

Dans la cellule pacemaker, le courant ‘funny’ (I_f) est un des courants dominants dans la génération de l’automatisme cardiaque. Ce courant a été découvert dans les cellules sinu-sales de lapin par deux groupes différents : en 1979 par le groupe de Brown, Noble et DiFrancesco (Brown et al., 1979) et, en 1980, par le groupe de Yanagihara et Irisawa (Yanagihara et al., 1980). Ensuite, I_f a été identifié dans toutes les cellules cardiaques de mammifères battant spontanément : les cellules du tissu nodal et les cellules du système de conduction cardiaque (DiFrancesco, 1993). Le courant transporté par I_f est généré par le passage de Na^+ et K^+ . Au cours de la dépolarisation diastolique (DD) le courant I_f net est entrant.

Une large famille de gènes de canaux HCN a été clonée chez la souris (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998) et chez l’humain (Seifert et al., 1999; Vaccari et al., 1999). Les quatre isoformes clonées sont appelées protéines canal HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*); HCN1 à HCN4. L’analyse de la séquence des isoformes de HCN indique que ces canaux appartiennent à la super famille des canaux K^+ potentiel dépendant et des canaux du CNG (*Cyclic Nucleotide Gated*).

Toutes les isoformes de HCN forment des canaux tétramériques (**Figure 11**). Chaque monomère est caractérisé par la présence de 6 domaines transmembranaires (S1-S6) avec un senseur de potentiel positif situé dans le 4^{ème} segment transmembranaire (S4). Dans la portion C-terminale des canaux HCN, il y a le domaine CNBD (*Cyclic Nucleotide Binding Domain*) qui est le site de fixation de l’AMPc.

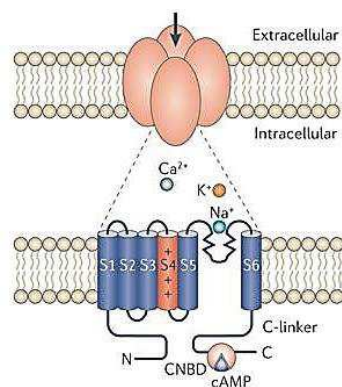


Figure 11 : *Représentation schématique du canal HCN.*

Haut : Représentation schématique du canal (tétramère, constitué de 4 sous-unités).

Bas : Représentation schématique d’un monomère avec les 6 segments transmembranaires, dont le segment S4 (en rouge) contenant le senseur de potentiel. Le domaine CNBD situé à l’extrémité C terminale permet la fixation de l’AMPc. (Postea and Biel, 2011)

La séquence primaire des 4 isoformes de HCN est fortement conservée au niveau des portions transmembranaires. L'homologie de séquence plus faible au niveau des extrémités N- et C- terminales des diverses isoformes peut expliquer leurs propriétés biophysiques différentes : cinétique, seuil d'activation et modulation par les nucléotides cycliques (Viscomi et al., 2001). Par exemple, la cinétique d'activation de HCN2 est plus rapide que celle HCN4, mais toutes deux sont plus lentes que HCN1 (Altomare et al., 2001; Viscomi et al., 2001). De plus, HCN1 a une sensibilité plus faible à l'AMPC que HCN2 et que HCN4. L'isoforme HCN3 n'est pas modulée par l'AMPc (Stieber et al., 2005).

La biologie moléculaire a permis d'identifier des différences importantes dans la distribution tissus-spécifique de chacune des 4 isoformes. HCN1, HCN2 et HCN4 se retrouvent dans l'ensemble des compartiments cardiaques (Stieber et al., 2004). HCN1 est présente dans le SAN, mais elle constitue l'isoforme majoritaire du cerveau. HCN4 est l'isoforme majeure de la portion centrale du SAN. Dans le NAV, HCN4 est l'isoforme principalement exprimée, suivie par HCN1 et HCN2. HCN3 est rarement exprimée dans le cœur adulte (Marionneau et al., 2005), mais elle est présente dans le cœur au stade embryonnaire (Stieber et al., 2003b) (**Figure 12**)

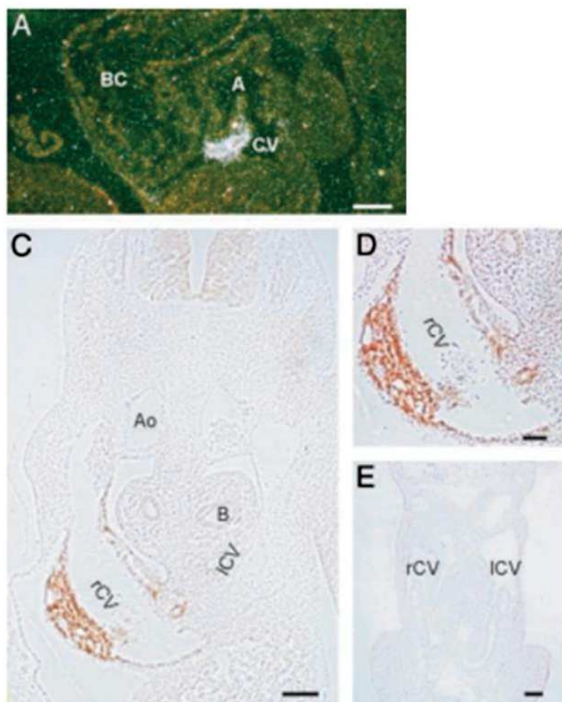


Figure 12 : Expression de l'ARNm et de la protéine HCN4 au stade embryonnaire 10.5 jours. (A) Détection en hybridation in situ de HCN4 par une ribosonde spécifique sur une coupe sagittale d'un embryon sauvage. A=chambre atriale, BC= Bulbus cordis, CV= veine cardinale. (C) Détection immunohistochimique de HCN4. Ao= Aorte, B= Bronche, rCV et lCV= veine cardinale droite et gauche. (D) Grossissement de (C) montrant HCN4 marqué dans la veine cardinale droite. (E) Coupe transversale des veines cardinales avec absence de coloration de HCN4. D'après (Stieber et al., 2003a)

Ce courant est caractérisé par 2 propriétés particulières.

En premier lieu, il est activé par une hyperpolarisation du potentiel de membrane et non par une dépolarisation comme la plupart des autres courants ioniques connus. C'est pour cela que ce courant avait été appelé « *f* », comme *funny* (le courant « drôle »). Dans les cellules du SAN et du NAV, le seuil d'activation de I_f est compris entre -50 et -65 mV (Baruscotti et al., 2005). Pour les cellules des fibres de Purkinje, le seuil d'activation est encore plus négatif : entre -90 et -60 mV (DiFrancesco, 1981a). En second lieu, le courant I_f possède une faible sélectivité face aux ions Na^+ et K^+ . Toutefois, la perméabilité pour les ions Na^+ est 4 fois supérieure à celle pour les ions K^+ (DiFrancesco, 1981b).

Le courant I_f est modulé par le système nerveux autonome (SNA). Il est augmenté par l'activation de la voie β -adrénergique. L'activation des récepteurs β induit une augmentation de la production d'AMPc, qui en retour se lie directement au canal *f*. Ceci provoque une régulation positive de I_f en déplaçant sa courbe d'activation vers des voltages positifs, sans affecter la conductance du canal (DiFrancesco and Tortora, 1991). La facilitation d'ouverture du canal dépendante de l'AMPc augmente la raideur de la pente de la phase de dépolarisation diastolique (DiFrancesco, 1993). A contrario, l'activation des récepteurs muscariniques, durant la stimulation parasympathique, provoque une diminution du taux d'AMPc et un déplacement de la courbe d'activation du courant I_f vers les potentiels plus négatifs. Ceci induit la diminution de la pente de la phase de dépolarisation diastolique (voir aussi **Figure 9**) (DiFrancesco and Tromba, 1988) ; (DiFrancesco et al., 1989). Des travaux sur les myocytes de Purkinje (Chang et al., 1991), ainsi que sur les cellules pacemakers du nœud sinusal (Liao et al., 2010) montrent que les canaux HCN natifs sont aussi une cible de régulation par la phosphorylation *via* la protéine kinase A. Le rôle de la régulation PKA-dépendante, par rapport à celle médiée par l'AMPc reste à élucider.

3.1.2 Courants calciques voltage dépendants

Les différentes classes de canaux calciques activés par le potentiel (VGCC) jouent un rôle central dans des processus physiologiques. En réponse aux changements de potentiels de membrane des cellules excitables, les VGCC génèrent un courant calcique entrant. L'influx calcique traversant ces canaux induit la dépolarisation membranaire. Comme les ions Ca^{2+} sont aussi un second messenger universel, l'influx calcique régule également une grande variété de processus intracellulaires dépendants du calcium tels la contraction musculaire, la transcription des gènes, la sécrétion hormonale, la libération des neurotransmetteurs, l'excitabilité et la plasticité synaptique (Nanou and Catterall, 2018; Striessnig et al., 2014; Zamponi et al., 2015). Le ciblage subcellulaire comme la dynamique d'entrée du calcium nécessitent d'être étroitement contrôlés par des sous-unités accessoires, des modifications post-traductionnelles des lipides et des protéines.

Les canaux calciques sont formés par différentes sous unités (**Figure 13**).

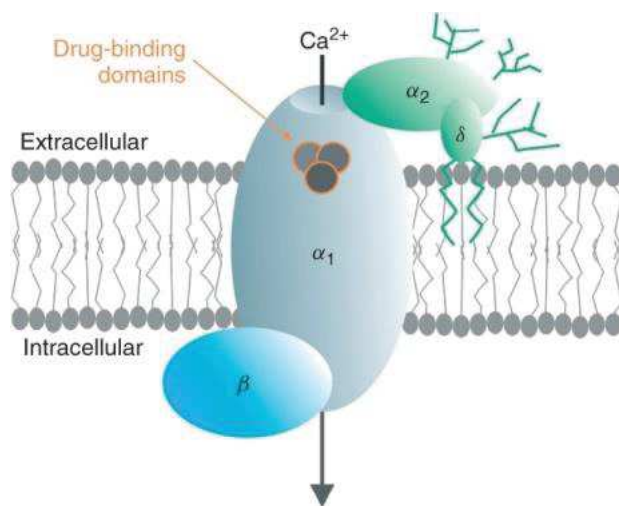


Figure 13 : Représentation schématique d'un canal calcique avec la sous-unité principale α_1 et les sous-unités auxiliaires (β et α_2 - δ).

Le pore sensible au potentiel de tous les VGCC est constitué par la sous-unité α_1 , qui forme l'élément central des différents types de canaux ioniques. La sous-unité α_1 est constituée de quatre domaines. Chaque domaine contient 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Le senseur de potentiel se localise au niveau du S4. Dix isoformes de sous-unité α_1 , codées par des gènes différents, ont été isolées (**Figure 14**).

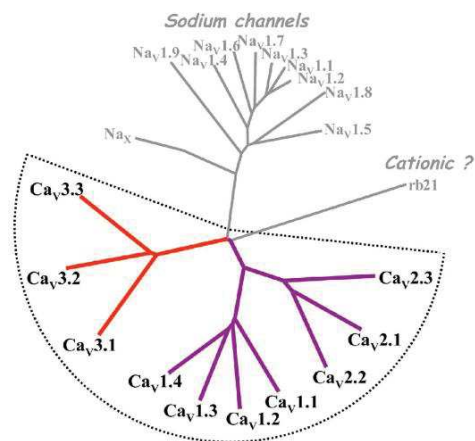


Figure 14 : Famille de gène codant pour les VDCCs. D'après (Mangoni et al., 2006a)

Les sous-unités α_1 s'associent avec des sous-unités auxiliaires (β et α_2 - δ) pour former des complexes hétéro-oligomériques. Les sous-unités β sont étroitement associées à la face cytoplasmique de la sous-unité α_1 , alors que les sous-unités α_2 - δ sont ancrées dans la membrane plasmique et interagissent avec les domaines extracellulaires de la sous-unité α_1 (**Figure 13**). Ces sous-unités accessoires influencent l'activité du canal. Elles sont impliquées dans la dépendance au potentiel, les cinétiques d'activation et de dé-activation. Elles régulent, également, le trafic des protéines vers la membrane (Dolphin, 2012).

La famille des VGCC est très vaste. Elle est divisée en 3 sous-familles : canaux calciques de type T, de type L et de type « non-L » comme les canaux de type P/Q, N et R. Chaque sous-famille est ensuite subdivisée en isoformes (Tableau 1 (Striessnig et al., 2014)). Les canaux calciques de type L (LTCC) et de type T (TTCC) sont aussi nommés, respectivement, canaux calciques de « hauts » et de « bas » seuils du fait de leurs caractéristiques de leur voltage d'activation. I_{CaL} est activé à des potentiels plus positifs que I_{CaT} . Alors que I_{CaL} est activé entre -50 et -30 mV avec un pic situé autour de 0 mV, I_{CaT} s'active à des potentiels compris entre -60 et -50 mV avec un pic situé autour de -30mV (Hagiwara et al., 1988). En outre, ces 2 courants sont aussi identifiés par leur dépendance au potentiel. L'inactivation de I_{CaT} est plus rapide que celle d' I_{CaL} . I_{CaT} démarre son inactivation à -90mV et il est totalement inactivé autour de -40 mV. La conductance des canaux de type T est plus faible que celle des types L, respectivement autour de 8 et 16 pS (Hagiwara et al., 1988; Perez-Reyes, 2003).

Pour les canaux calciques de type L, la sous-unité $Ca_v1.1$ est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique dans lequel elle est responsable du couplage entre excitation et contraction (Tanabe et al., 1988). Elle est très faiblement présente dans le cœur (Marionneau et al., 2005). La sous-unité $Ca_v1.2$ est exprimée dans l'ensemble des différents tissus cardiaques (Marionneau et al., 2005; Rosati et al., 2007)), dans le muscle lisse (Moosmang et al., 2003), dans le pancréas (Schulla et al., 2003), dans le cerveau et dans les glandes surrénales (Moosmang et al., 2005). La sous-unité $Ca_v1.3$ est exprimée dans le cerveau, dans le pancréas, dans la cochlée et dans les tissus nodaux du SAN et du NAV (Marionneau et al., 2005). La sous-unité $Ca_v1.4$ est exclusivement exprimée dans la rétine (Baumann et al., 2004; Striessnig and Koschak, 2008).

Les canaux calciques de type non L (type P/Q, N et R) sont principalement exprimés dans les neurones et les cellules endocrines. Seule la sous-unité $Ca_v2.3$ est exprimée, dans une faible mesure, dans les oreillettes. Du côté de canaux calciques de type T, seules les sous-unités de type T $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ sont présentes dans le cœur (Mangoni et al., 2006a). La sous-unité $Ca_v3.2$ est fortement exprimée dans le cœur embryonnaire, mais son expression décline à l'âge adulte. Au stade adulte, la sous-unité $Ca_v3.1$ est présente essentiellement au niveau des tissus automatiques. La sous-unité $Ca_v3.3$ est exclusivement neuronale.

TABLE 1Voltage-Gated Ca²⁺ Channel Types and Their Pore-Forming Subunits¹

| Type | α 1 Subunit (Old Nomenclature, Gene) | Predominant Tissue Expression | Pharmacology |
|----------|---|--|---|
| Cav1 L | Cav1.1 (α 1S; CACNA1S) | Skeletal muscle | Dihydropyridines (isradipine and nifedipine), phenylalkylamines (verapamil), and benzothiazepines (diltiazem) |
| | Cav1.2 (α 1C; CACNA1C) | Heart/smooth muscle, neurons (somatodendritic), and endocrine cells | |
| | Cav1.3 (α 1D; CACNA1D) | Heart, neurons (somatodendritic), endocrine cells, and sensory cells | |
| | Cav1.4 (α 1F; CACNA1F) | Retina and immune cells | |
| Cav2 P/Q | Cav2.1 (α 1A; CACNA1A) | Neurons and endocrine cells | ω -Agatoxin IVA and ω -conotoxin MVIIC |
| | N Cav2.2 (α 1B; CACNA1B) | Neurons and endocrine cells | ω -Conotoxin GVIA |
| | R Cav2.3 (α 1E; CACNA1E), Cav? | Cardiac/smooth muscle, endocrine cells, and neurons | SNX-482 |
| Cav3 T | Cav3.1 (α 1G; CACNA1G) | Neurons and cardiac muscle | TTA-A2 and Z944 |
| | Cav3.2 (α 1H; CACNA1H) | Cardiac/vascular smooth muscle, kidney, and liver | |
| | Cav3.3 (α 1I; CACNA1I) | Neurons | |

Tableau 1 : Les différents sous-types de canaux calcique activés par le voltage et leur localisation tissu spécifique. D'après (Striessnig et al., 2014)

Les VGCC cardiaques font l'objet de multiples mécanismes régulateurs impliquant à la fois des sites de régulation intramoléculaires, des interactions avec des seconds messagers et des protéines kinases. L'influx calcique traversant les VGCC peut autoréguler l'activité du canal tant de manière négative (CDI : Inactivation Calcium Dépendante) que positive (CDF, Facilitation Calcium Dépendante). Les canaux calciques de type L subissent une inactivation *via* les calmodulines et une facilitation par le biais de la calmoduline kinase II (CaMKII). Au contraire, seule la facilitation par les CaMKII a été décrite pour les canaux calciques de type T (Christel et al., 2012). Les canaux calciques de type L sont également fortement régulés par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (De Jongh et al., 1996; Ramadan et al., 2009). La régulation des canaux calciques de type T par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc est encore controversée (Chemin et al., 2006). Cependant, dans une étude récente, Li et collaborateurs (Li et al., 2012) ont démontré que dans les myocytes cardiaques l'activité des canaux VGCCs de type T est augmentée par l'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique, et que cette régulation est strictement liée à la machinerie adénylate cyclase / AMPc/ protéine Kinase A, comme pour les canaux de type L.

Une des différences essentielles concernant la modulation des canaux de type T et des canaux de type L réside dans leur sensibilité divergente aux dihydropyridines (DHPs). Les DHPs sont connues pour agir sur les canaux L sans affecter les canaux de type T (Hagiwara et al., 1988). Néanmoins, ce concept a été discuté par différentes études qui démontrent un effet de certains types de DHPs sur différentes sous-unités des canaux VGCCs de type T (Bladen et al., 2014a; Bladen et al., 2014b).

3.1.3 Courant sodique voltage dépendant

Les canaux sodiques sont formés par une sous-unité α pseudo-tétramérique qui s'associe avec une ou deux sous-unités β . Chaque sous-unité α est composée de 4 répétitions d'une structure de base comportant 6 domaines transmembranaires. Le pore est formé par les boucles comprises entre les domaines 5 et 6. Le domaine senseur du voltage est composé par le domaine 4, riche en résidus chargés positivement. Les sous-unités β sont régulatrices (**Figure 15**).

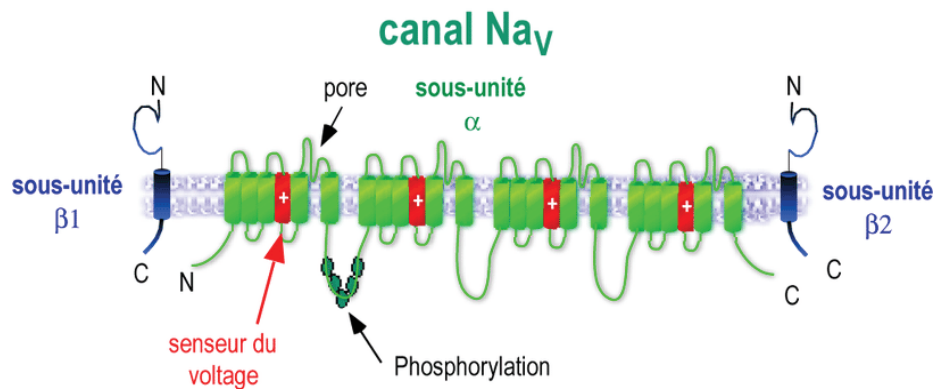


Figure 15 :
Structure des canaux Na_V avec la sous-unité α et les sous-unités β régulatrices.

Comme le démontrent les expériences d'expression hétérologue, la sous-unité α détermine les principales propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques d'un canal sodique donné. Les différentes sous-unités β ont, quant à elles, la fonction de moduler la sous-unité α (Patton et al., 1994).

La sous-unité α du canal sodique a un profil d'expression tissu-spécifique. A ce jour, neuf sous-types de sous-unité sodique Na_V1 , nommées $Na_V1.1$ à $Na_V1.9$, ont été clonées. Une nouvelle famille de canaux sodiques Na_V2 a été découverte récemment, mais sa fonction reste peu encore connue (**Tableau 2**) (Goldin, 2001).

$Na_V1.1$, 1.2, 1.3 et 1.6 sont les canaux sodiques principaux du système nerveux central. $Na_V1.7$, 1.8 et 1.9 constituent les canaux sodiques majoritaires du système nerveux périphérique. $Na_V1.4$ est la sous-unité principale du muscle squelettique alors que $Na_V1.5$ est la sous-unité sodique du cœur. La plupart de ces canaux sodiques ont également des niveaux d'expression significatifs hors de leur tissu primaire.

| Type | Gene symbol | Chromosomal location | Primary tissues |
|---------------------|----------------|-------------------------|----------------------------------|
| Na _v 1.1 | SCN1A | Mouse 2 Human 2q24 | CNS neurons |
| Na _v 1.2 | SCN2A | Mouse 2 Human 2q23-24 | CNS neurons |
| Na _v 1.3 | SCN3A | Mouse 2 Human 2q24 | CNS neurons |
| Na _v 1.4 | SCN4A | Mouse 11 Human 17q23-25 | SkM |
| Na _v 1.5 | SCN5A | Mouse 9 Human 3p21 | Uninnervated SkM, heart |
| Na _v 1.6 | SCN8A | Mouse 15 Human 12q13 | CNS neurons |
| Na _v 1.7 | SCN9A | Mouse 2 Human 2q24 | PNS neurons |
| Na _v 1.8 | SCN10A | Mouse 9 Human 3p22-24 | DRG neurons |
| Na _v 1.9 | SCN11A | Mouse 9 Human 3p21-24 | DRG neurons |
| Na _x | SCN7A SCN6A | Mouse 2 Human 2q21-23 | uterus, astrocytes, hypothalamus |

Tableau 2 : Les différents sous-types de canaux sodiques activés par le voltage et leur localisation tissu spécifique. De (Goldin, 2001)

Tous les sous-types de canaux sodiques connus à ce jour peuvent être classés en fonction de leur sensibilité à tétrodothine (TTX). La TTX est une neurotoxine isolée à partir du poisson japonais Fugu (**Figure 16**) (Catterall et al., 2003; Yu and Catterall, 2003).

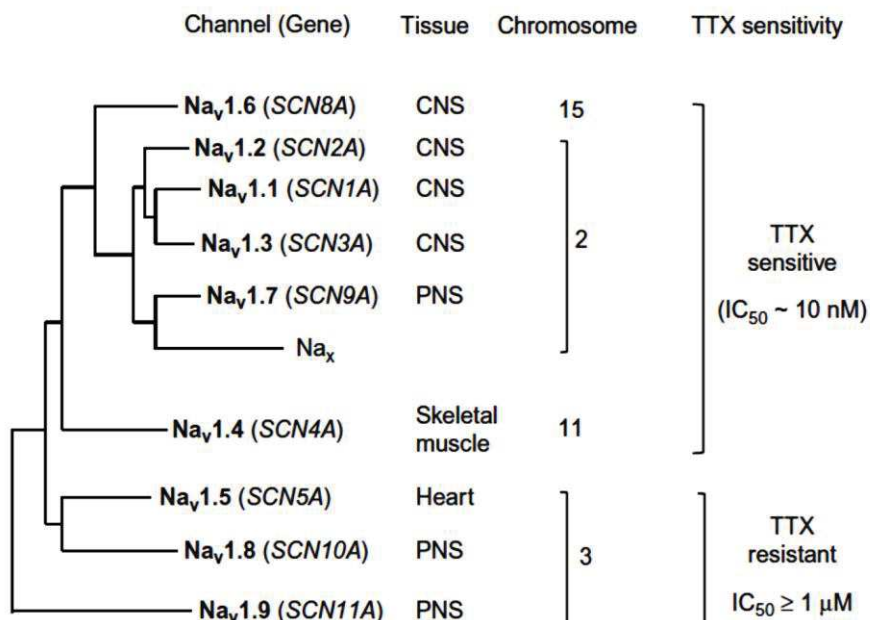


Figure 16 : Arbre cladistique représentant les canaux sodiques voltages dépendants

Plusieurs évidences démontrent que le principal canal sodique cardiaque est l'isoforme $Na_v1.5$ (Gellens et al., 1992). Ce canal est classé parmi les canaux sodiques résistants à la TTX. De plus, de récentes études ont identifié le rôle de la sous-unité $Na_v1.8$ (TTX résistante) dans la conduction cardiaque. La sous-unité $Na_v1.8$ serait impliquée au niveau des intervalles PR et QRS des ECG de surface (Chambers et al., 2010). Etant donnée l'expression spécifique de ce canal dans les neurones nociceptifs sensoriels de petit et de moyen diamètre au sein des ganglions rachidiens dorsaux (DRG), ces données sont très surprenantes. Les isoformes TTX résistantes et TTX sensibles des canaux sodiques ont été détectées dans les préparations d'ARN cardiaque. En particulier, Marrionneau et collaborateurs ont mis en évidence l'expression des mRNAs codants pour les sous-unités $Na_v1.1$, $Na_v1.3$ and $Na_v1.7$ dans le SAN et le NAV (Marionneau et al., 2005).

3.1.4 Courant potassique

Les canaux potassiques voltages dépendants (VDKCs) contrôlent la phase de repolarisation du potentiel d'action dans les cellules spontanément actives et dans le myocarde. Dans les cellules pacemaker, 3 principaux canaux potassiques voltage dépendant ont été identifiés : les courants rectifiants rapides (I_{kr}) et (I_{ks}), ainsi que le courant transitoire sortant (I_{to}) (Boyett et al., 2000).

Les canaux I_{Ks} , I_{Kr} sont formés de tétramères de sous-unités identiques (**Figure 17**). Chaque sous-unité α possède 6 hélices transmembranaires (S1-S6). S1-4 est le domaine sensible au voltage avec les résidus chargés positivement sur le segment S4 (senseur de voltage). S5-6 constitue le pore du domaine qui conduit le courant ionique. Le canal I_{Ks} est composé de KCNQ1, formant le pore et de la sous-unité auxiliaire KCEN1 (Barhanin et al., 1996). Le canal I_{Kr} est constitué de la sous unité hERG.

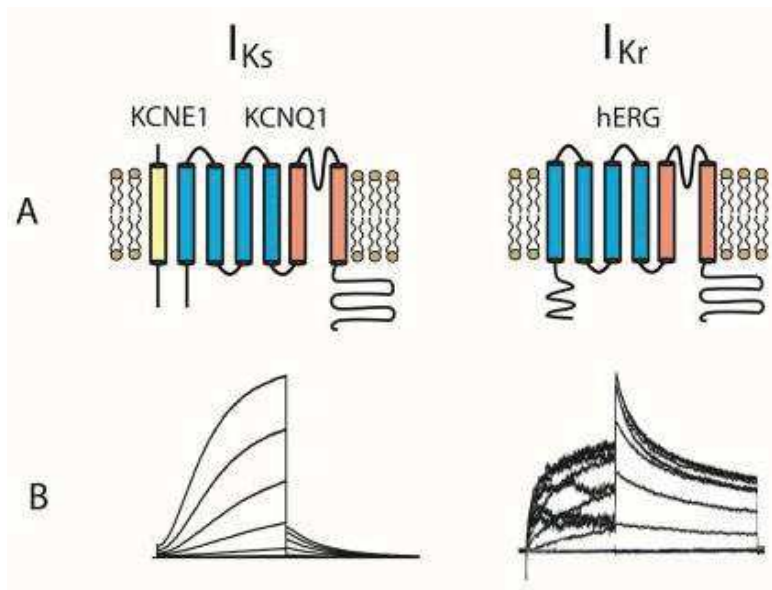


Figure 17 : *Courants cardiaques correcteurs retardés I_{Ks} , I_{Kr} . Panel A: Composition moléculaire et architecture de ces canaux. Panel B: Enregistrements des courants I_{Ks} et I_{Kr} . Adapté de (Decher et al., 2004).*

Les canaux I_{Ks} sont activés lentement par des voltages dépolarisants. Ces quatre sous-unités forment un canal fonctionnel. L'assemblage de la protéine KCNE1 (une protéine à un seul domaine transmembranaire) avec KCNQ1 lui confère sa cinétique lente unique (Barhanin et al., 1996). L'activité physiologique du canal I_{Ks} nécessite le co-assemblage de KCNQ1 et KCNE1.

Le courants I_{Kr} est conduit par le canal hERG (aussi dénommé Kv11.1 ou KCNH2). Ce canal a été le cloné, pour la première fois, dans le cerveau comme un homologue du canal potassique "ether-a-go-go" (EAG) de la drosophile. Par la suite, son lien avec les variants de LQTS 2 associés au syndrome du QT long (LQT2), a été mis en évidence (Curran et al., 1995; Sanguinetti et al., 1995; Warmke and Ganetzky, 1994).

Alors que les canaux I_{Ks} et I_{Kr} sont tous les deux activés par les voltages dépolarisants pendant la phase de repolarisation des potentiels d'action, ils diffèrent biophysiquement sur plusieurs points (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990). Leurs fonctions différentes peuvent être étudiées en utilisant des bloqueurs spécifiques de chacun de ces canaux : E4031 pour I_{Kr} et Chromanol 293B pour I_{Ks} (Matsuo et al., 2015).

En conditions normales, I_{Kr} joue un rôle majeur dans la repolarisation. Il est caractérisé par une rectification entrante importante provoquée par l'inactivation voltage dépendante. A des potentiels plus positifs, les canaux sont inactivés et conduisent un courant sortant plus petit. Lorsque la repolarisation progresse, les canaux I_{Kr} récupèrent de l'inactivation et produisent un courant sortant de grande amplitude qui repolarise le potentiel membranaire.

Les canaux I_{Ks} ont une petite inactivation, ils s'activent lentement. Ils impactent graduellement la repolarisation cellulaire (**Figure 17**). Le rôle de I_{Ks} est rehaussé sous l'effet de certains facteurs de stress comme la stimulation adrénergique. Sous de telles conditions, les courant I_{Ks} sont plus grands, s'activent plus rapidement et se désactivent plus lentement pour permettre une action raccourcie du potentiel d'action. Ceci permet de maintenir des temps de remplissage diastoliques adéquats quand la fréquence cardiaque augmente.

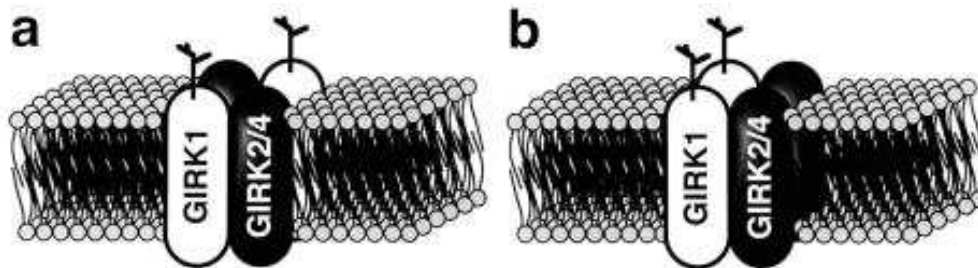
Le courant I_{to} est caractérisé par une activation rapide et une cinétique d'inactivation typique. Pharmacologiquement, il peut être identifié grâce à sa sensibilité à la 4 amino-pyridine (4-AP). Les canaux I_{to} sont codés par la famille de gène Kv1 et Kv4. A ce jour, leur composition dans le SAN et le système de conduction n'est pas encore connue. La protéine KChIP2 s'associe avec le complexe du canal I_{to} et régule l'inactivation et l'adressage du canal à la membrane cellulaire (An et al., 2000).

Le courant potassique activé par l'acétylcholine (I_{KACH})

Le courant I_{KACH} est fortement exprimé dans le SAN, les oreillettes et le NAV (DiFrancesco et al., 1989); (Giles and Noble, 1976; Noma and Trautwein, 1978). Dans ces tissus, I_{KACH} est activé par les récepteurs muscariniques M_2 et par le récepteur A_1 à l'adénosine par une liaison directe des sous-unités des protéines G au complexe du canal Girk4-Girk1 (Wickman and Clapham, 1995; Wickman et al., 1999). Quatre isoformes Girk1-4 (Kir3.1 à Kir 3.4 selon la nouvelle nomenclature) codent pour les canaux I_{KACH} (Wickman and Clapham, 1995). Au niveau cardiaque, les canaux Girk4-Girk1 sont des complexes tétramériques contenant les canaux Girk1 et Girk4 (Wickman et al., 1999) (**Figure 18**). Cependant les souris déficientes pour le canal Girk4 n'ont pas

d' $I_{K_{ACh}}$ cardiaque (Wickman et al., 1998), car le canal Girk1 requiert le canal Girk4 pour être adressé à la membrane des cellules (Kennedy et al., 1999).

Figure 18 : Structure tétramérique de Girk1/4. D'après (Yamada et al., 1998)



3.1.4 Courant I_{st}

Le courant entrant soutenu (I_{st}) est décrit comme étant un nouveau courant entrant dans les cellules du SAN de plusieurs espèces de mammifères, incluant le lapin, le cochon d'Inde, le rat et la souris (Cho et al., 2003 ; Guo and Noma, 1997 ; Guo et al., 1995 ; Shinagawa et al., 2000 ; Toyoda et al., 2005).

Le courant I_{st} est activé à bas potentiel (autour de -70 mV chez la souris). Il soutient un courant entrant persistant pendant toute la phase de la dépolarisation diastolique. Il a été proposé que ce courant joue un rôle physiologiquement important lors de la dépolarisation diastolique (Mitsuiye et al., 2000). Le manque de bloqueur spécifique de ce canal limite la compréhension de son rôle physiologique dans l'activité pacemaker automatique du SAN. Alors que le courant I_{st} est porté par les ions Na^+ , sa pharmacologie ressemble fortement à celle des courants $I_{Ca,L}$. En effet, I_{st} n'est pas affecté par la tétrodotoxine (TTX) qui bloque les canaux sodiques voltage-dépendant, mais il est inhibé par de multiples bloqueurs organiques chimiques des canaux calciques, comme les DHPs. Il est renforcé par l'activateur du courant $I_{Ca,L}$, le Bay-K8644. De plus, comme $I_{Ca,L}$, I_{st} est également stimulé par l'activation β -adrénergique. Ces propriétés pharmacologiques étant fortement spécifiques au courant $I_{Ca,L}$, ceci a suggéré la possibilité que le pore formant la sous-unité α_1 des canaux calciques de type L, qui contient le site de liaison aux bloqueurs et activateurs calciques est essentiel pour l'activité d' I_{st} . Cette hypothèse a été confirmée récemment au laboratoire, grâce à l'identification de $Ca_v1.3$ comme un

déterminant critique pour la génération de I_{st} (Toyoda et al., 2017). Le mécanisme exact par lequel les canaux $Ca_v1.3$ génèrent le courant $Na^+ I_{st}$ reste toutefois à élucider.

3.2 Description du potentiel d'action pacemaker

Le potentiel d'action pacemaker est le résultat d'une interaction fonctionnelle complexe entre plusieurs classes de canaux ioniques. Il est caractérisé 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. La dépolarisation diastolique nécessite à chaque instant un courant net entrant, généré par les canaux ioniques de la membrane plasmique, pour pouvoir maintenir la dépolarisation du potentiel de membrane. Il est possible de visualiser l'activation séquentielle des canaux ioniques au cours de l'activité automatique à l'aide de la modélisation numérique (Figure 19).

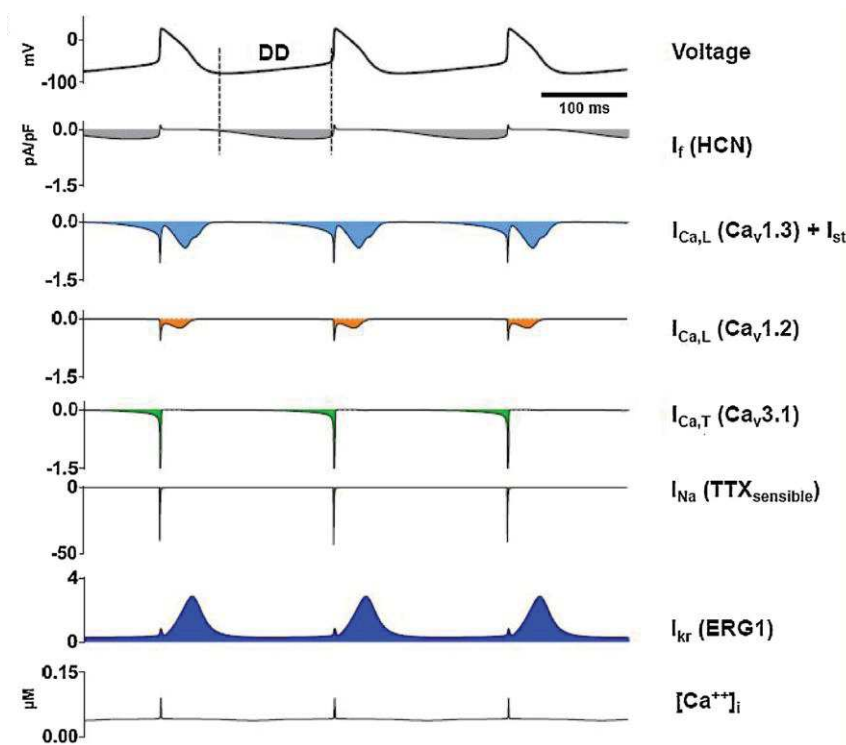


Figure 19 : (A) Simulation numérique de l'activité spontanée d'une cellule pacemaker de souris, montrant le potentiel d'action (en mV) avec la dépolarisation diastolique (DD) et les courants ioniques contribuant à l'automatisme. Modèle numérique utilisé chez (Christel et al., 2012)

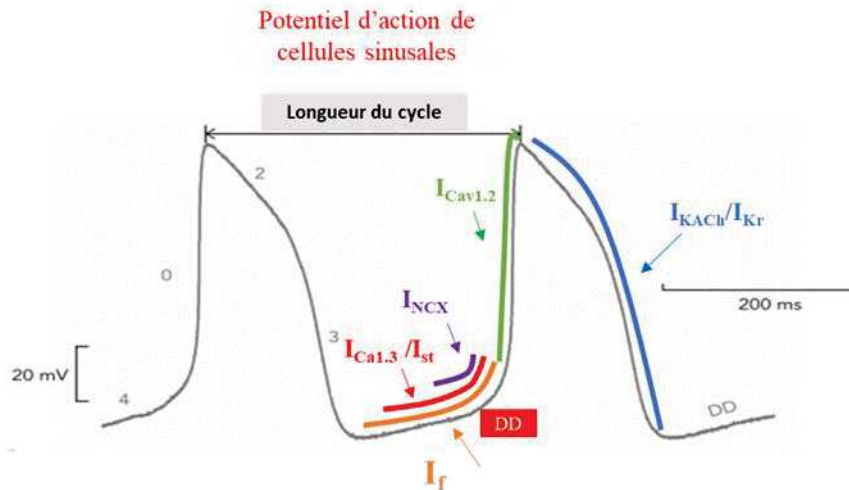


Figure 19 : (B) Exemple typique du potentiel d'action d'une cellule sinusale avec les différents courants ioniques impliqués. Activation séquentielle des différents courants au cours de la DD et du PA.

Le premier courant à s'activer pour initier la dépolarisation diastolique est le courant I_f . Au tout début de la dépolarisation diastolique, nous observons aussi l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type T (I_{CaT}). Quand la membrane se dépolarise autour de -50 mV, les canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ s'ouvrent. L'ouverture de ces canaux induit une entrée supplémentaire de calcium dans la cellule, qui en complément de l'échangeur Na/Ca, dépolarise davantage le potentiel de membrane jusqu'à ce qu'il atteigne le seuil du potentiel d'action (en général autour de -40 mV). A ce potentiel, les canaux $Ca_v1.2$ de type L et les canaux sodiques sensibles à la TTX s'ouvrent afin de générer la phase ascendante du potentiel d'action. La repolarisation du potentiel d'action nécessite un courant net sortant (**Figure 19**). Celui-ci est fourni par les canaux potassiques voltage-dépendants. Parmi ces canaux, le mieux caractérisé est le canal HERG1, qui code pour le canal I_{Kr} sensible. Le courant I_{Kr} est présent principalement dans la phase tardive de la repolarisation et dans la phase diastolique à cause de sa cinétique de désactivation lente. Par conséquent, la somme des courants entrants qui génèrent la dépolarisation diastolique comme I_f , I_{CaT} et $I_{Ca_v1.3}$ doit être supérieure à I_{Kr} pour pouvoir maintenir la dépolarisation diastolique. (Di Francesco and Noble, 1985; Mesirca et al., 2018).

4. Physiopathologie de l'automatisme cardiaque: la maladie rythmique de l'oreillette

La maladie rythmique de l'oreillette, aussi appelée aussi SSS pour « *Sick Sinus Syndrome* », a été décrite par Short, pour la première fois en 1954. Celui-ci a énoncé que « parmi le grand nombre de patients atteints de syncopes, il y en a quatre dont l'examen a révélé de la bradycardie sinusale alternant avec des phases prolongées de tachycardie auriculaire ». Ces 4 patients ne présentaient aucune lésion structurale au niveau du nœud sinusal (Short, 1954).

Historiquement, le terme de maladie rythmique de l'oreillette (ou SSS) a été formulé par Lown B, 13 ans plus tard en 1967, dans son article intitulé '*Electrical Reversion of Cardiac Arrhythmias*'. Il a défini le SSS comme « un défaut dans l'élaboration ou la conduction de l'impulsion sinusale caractérisée par une activité atriale chaotique, des changements de contours de l'onde P, de la bradycardie entrecoupée de battements ectopiques multiples et récurrents, avec des épisodes de tachycardie auriculaire et nodale (Figures 20 et 21) (Lown, 1967). Cette définition du SSS est toujours valable de nos jours.

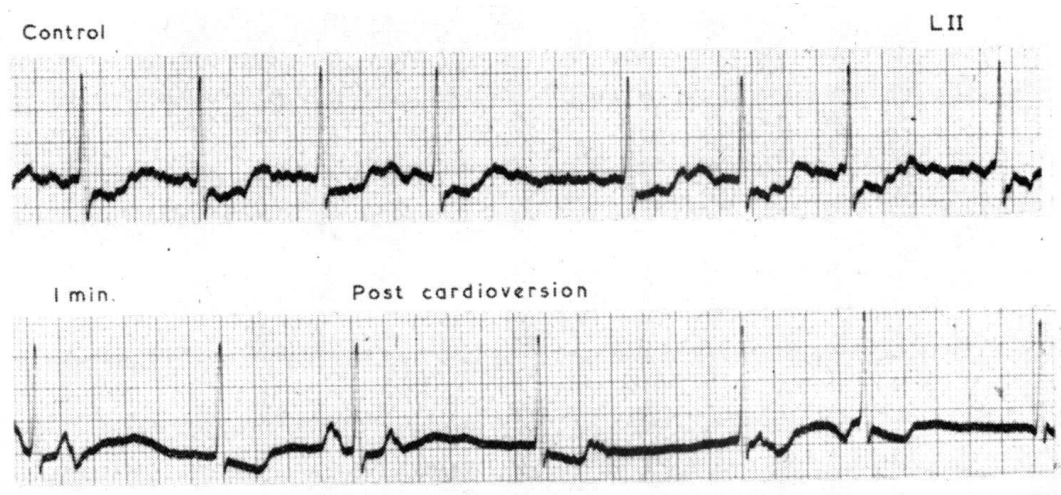


Figure 20 : *Electrocardiogramme humain représentant une longue phase de fibrillation atriale, objet d'une cardioversion électrique. La cardioversion arrête la fibrillation, toutefois le retour au rythme sinusale dévoile un SSS sous-jacent. Il faut remarquer l'irrégularité des ondes P accompagnée de battements nodaux fréquents.*

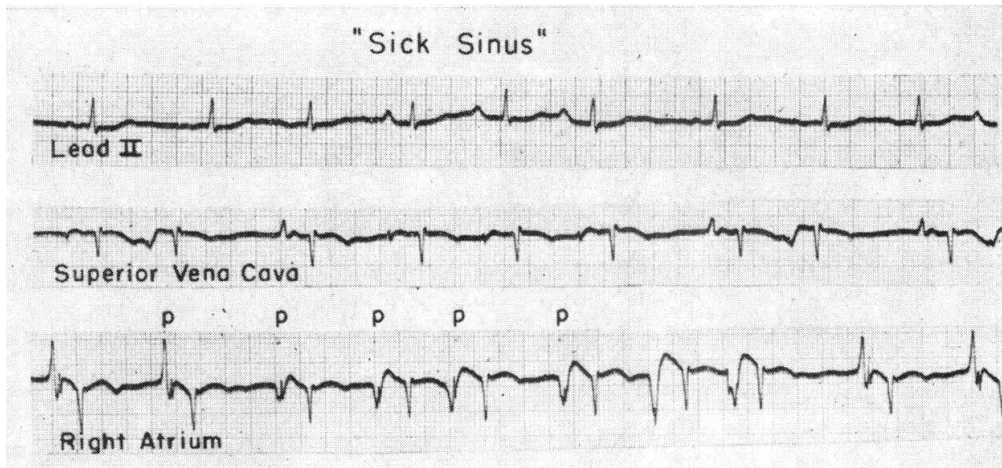


Figure 21 : *Maladie de l'oreillette montrant des changements de morphologie des ondes P, comme enregistré en dérivation 2, au niveau de la veine cave supérieure et dans l'oreillette droite.*

Les origines du SSS peuvent être divisées selon des causes intrinsèques et des facteurs extrinsèques qui perturbent la fonction du nœud sinusal (**Tableau 3**).

| <i>Facteurs favorisant les causes du SSS</i> | |
|---|---|
| Causes intrinsèques | Causes extrinsèques qui miment ou qui exacerbent le SSS |
| Fibrose dégénérative Toute maladies infiltrantes Amylose Maladie du tissu conjonctif Hémochromatose Sarcoïdose Dysfonction des canaux ioniques Remodelage du SAN | Dysfonction du SAN Hypersensibilité du sinus carotidien Syncope neurocardiogène Syncope vasovagal Augmentation du tonus vagal (survient chez les athlètes et pendant le sommeil) Troubles métaboliques Hyperkaliémie Hypocalcémie Hypokaliémie Hypothermie Hypothyroïdie Hypoxie Apnée Syndrome d'apnée obstructive du sommeil Agents pharmacologiques Médicaments Anti-arythmiques (classe I et II) Béta-bloquant Inhibiteurs des canaux calciques (non dihydropyridine) Digoxine Lithium Médicaments sympatholytiques Toxine |

Tableau 3 : Causes du Sick Sinus Syndrome (Adan and Crown, 2003; Dobrzynski et al., 2007; Epstein et al., 2008; Mangrum and DiMarco, 2000)

Les causes intrinsèques incluent la fibrose dégénérative du tissu pacemaker, les dysfonctions des canaux ioniques et le remodelage du nœud sinusal. La cause intrinsèque la plus commune est la dégénérescence du SAN liée à l'âge. Des recherches récentes et la compréhension des familles atteintes de SSS d'origine congénitale ont mis en évidence que les dysfonctions héréditaires des canaux ioniques du nœud sinusal occupent une part significative du développement du SSS lié à l'âge. Chez certains patients, le remodelage du SAN, se produisant lors de l'insuffisance cardiaque et de la fibrillation atriale, semble jouer un rôle dans le développement du SSS. Certains processus pathologiques infiltrant, dont les maladies des tissus conjonctifs, hémochromatose, sarcoïdose et amylose peuvent également provoquer des dysfonctionnements du SAN d'origine intrinsèque (Benson et al., 2003; Jones, 2007 #2753; Dobrzynski et al., 2007; Holm et al., 2011; Jones et al., 2007; Mangrum and DiMarco, 2000; Yeh et al., 2009).

Plusieurs causes externes peuvent affecter la fonction rythmique du nœud sinusal, en mimant ou exacerbant le SSS. Ceci peut survenir lorsqu'il y a une augmentation anormale du tonus vagal telle qu'une hypersensibilité du sinus carotidien, une syncope vasovagale et une dysfonction automatique. En outre, les dérangements métaboliques comme l'hypothyroïdie, l'hyperkaliémie, l'hypokaliémie, l'hypocalcémie, l'hypoxie et l'hypothermie peuvent entraîner une dépression de la fonction rythmique de stimulation du nœud sinusal. L'apnée obstructive du sommeil peut, également, provoquer une bradycardie par hypoxie profonde lors d'épisodes d'apnéiques. L'augmentation de la pression intracrânienne (réflexe de Cushing) peut déclencher une bradycardie. Plusieurs agents pharmacologiques utilisés en clinique, comme les β -bloquants, les bloqueurs des canaux calciques, la digoxine, les médicaments sympatholytiques, les médicaments anti-arythmiques, le lithium, peuvent produire un effet similaire sur le SAN. (Alboni et al., 1991; Chandran et al., 2013; Chen-Scarabelli and Scarabelli, 2004; Gauer, 2011; Mangrum and DiMarco, 2000; Moya et al., 2009; Oudit et al., 2007).

Le SSS est relativement commun chez les personnes âgées. Il affecte une personne sur 600 dans la tranche d'âge de plus de 65 ans. La moyenne d'âge d'apparition du SSS se situe entre 73 et 76 ans (Dobrzynski et al., 2007).

Du fait du vieillissement de la population, Jensen et ses collaborateurs ont estimé que le nombre de diagnostic de SSS, au moins aux Etats-Unis, va plus que doubler au cours des 50 prochaines années (Jensen et al., 2014) (**Figure 22**).

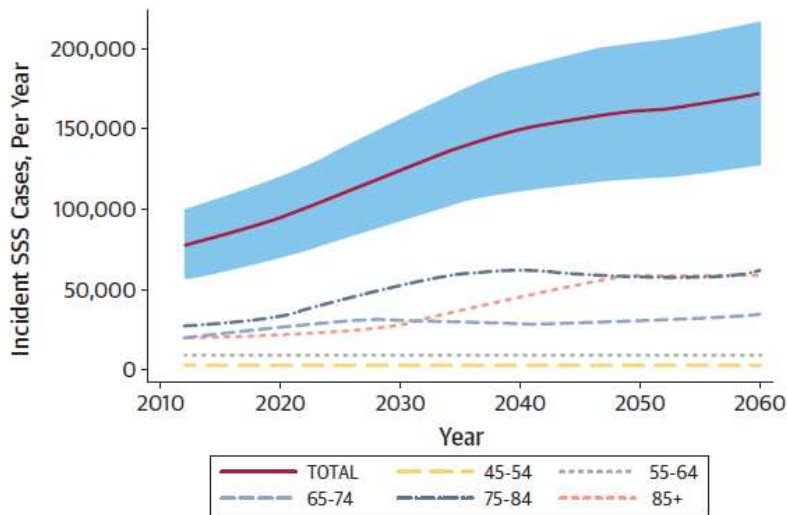


Figure 22 :
Courbe
représentant
l'incidence
du nombre de
cas annuels
de SSS pour
la population
générale et
par catégorie
d'âge, pour
les Etats-
Unis, entre
2012 - 2060
(Jensen et al.,
2014).

Un rapport de Wauthy, en 2011, montre les chiffres d'implantation des pacemakers en Europe de l'ouest (**Figure 23**). Le nombre d'implantation ne fait qu'augmenter d'année en année (**Figure 24**).

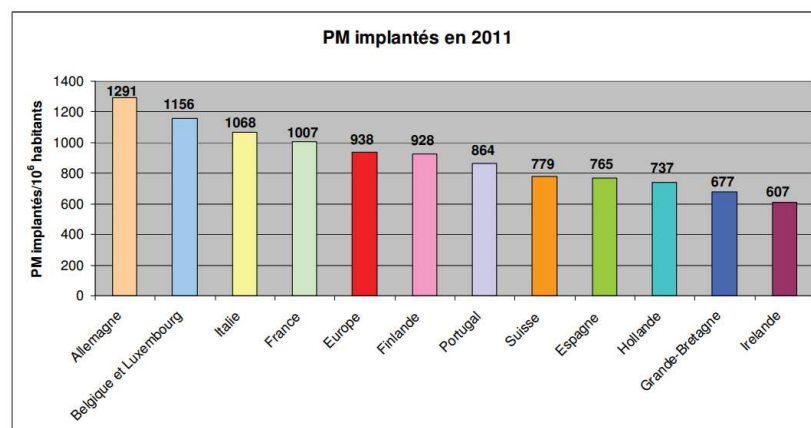


Figure 23 : *Nombre d'implantation de pacemaker électronique en 2011 en Europe de l'ouest.*

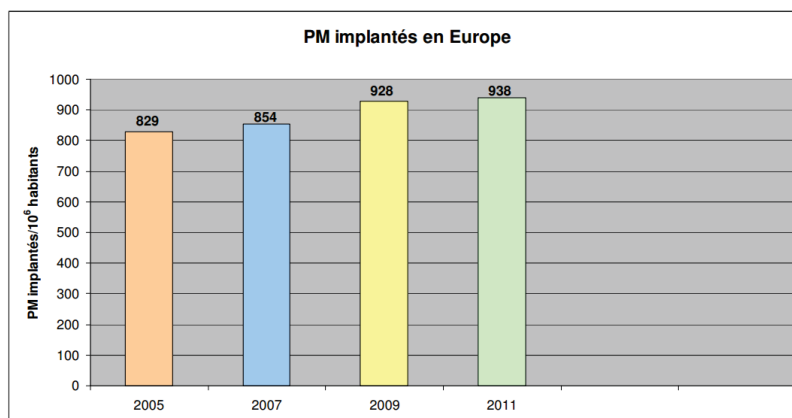


Figure 24 : Nombre d'implantation de pacemaker en Europe de 2005 à 2011.

Les patients âgés affectés par le SSS n'ont souvent pas d'antécédents cardiaques préexistants ni de signes de maladie cardiaque. Bien que la maladie du SSS soit prépondérante chez les personnes âgées, elle peut survenir à tout âge, y compris durant l'enfance. Dans ce cas, elle est généralement associée à une cardiopathie congénitale ou à une chirurgie cardiaque corrective antérieure.

Plus de 50 % des patients atteints de SSS développent un syndrome dit de tachy-bradycardie. Dans ce syndrome, la SSS est accompagné de fibrillation atriale ou de flutter. L'existence d'une tachycardie atriale conduit à une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral embolique. Ces patients ont également un risque de développer des BAV (0,5-1,5 % / an) (Andersen et al., 1998; Kristensen et al., 2001). Chez les sujets atteints de SSS, une réponse inadaptée à l'exercice peut parfois suggérer une incompétence chronotrope (Epstein et al., 2008).

Le seul traitement efficace pour pallier les symptômes du SSS est l'implantation d'un pacemaker électronique permanent. A ce jour, le SSS constitue l'indication la plus fréquente d'implantation d'un pacemaker électronique. Aux Etats-Unis, les cas de SSS représentent 30 à 50 % des implantations (Adan and Crown, 2003; Monfredi and Boyett, 2015).

Malgré son efficacité incontestable, il faut considérer que l'implantation d'un pacemaker électronique présente des contraintes, des limitations et des complications. Parmi celles-ci, nous pouvons citer : la perforation du myocarde, l'hématome au niveau de la plaie, les infections, le délogement ou le dysfonctionnement de la sonde au niveau auriculaire et/ou ventriculaire, le pneumothorax ou l'hémothorax, le problème de l'implantation en pédiatrie, les dysfonctions du dispositif, le coût, les aspects psychologiques et les contraintes pour la vie quotidienne (Kiviniemi et al., 1999).

Dans l'ensemble, les complications liées aux pacemakers électroniques ne sont pas mineures. En 2007, un rapport a publié les résultats d'une enquête, réalisée par la commission d'excellence clinique, sur les pacemakers permanents implantés dans les hôpitaux publics de Nouvelle Galles du sud en Australie. Ce rapport montre que le taux global de complications liées à l'implantation de stimulateurs cardiaques atteint environ 12 % (**Figure 25**). Cette valeur est conforme à ce qui est décrit dans la littérature internationale.

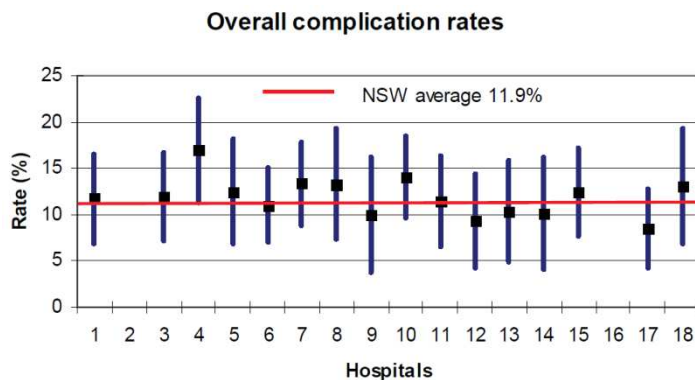


Figure 25 : Graphique représentant le pourcentage de complications liées à l'implantation d'un pacemaker électronique dans 16 hôpitaux. Le taux global de complication atteint 12 % avec un intervalle de confiance de 95 % (10,6 %, 13,2 %).

L'incidence relativement élevée de SSS combinée au pourcentage non négligeable du taux de complications, survenant pendant ou après l'implantation d'un stimulateur cardiaque, souligne l'importance d'étudier et de découvrir de nouvelles thérapies alternatives contre cette pathologie. Les nouvelles thérapies devront pallier à cette pathologie sous différents angles : la génération de pacemakers biologiques (Rosen, 2014) et/ou le développement de nouvelles approches pharmacologiques ou de thérapie génique (Mesirca et al., 2014).

5. La tertiapine-Q

Un extrait de venin d'abeille (*Apis mellifera*) a été testé sur des ovocytes de xénope co-exprimant 2 sous-unités cardiaques différentes des canaux potassiques activés par les protéines G, Girk1 et Girk4. Le fractionnement des composants de ce venin par une chromatographie liquide à haute pression (HPLC) a permis l'identification d'un peptide actif dont la composition et la structure ont pu être déterminées par spectroscopie de masse et RMN. Il s'agit d'un petit peptide de 21 acides aminés, appelé tertiapine (Gauldie et al., 1976; Xu and Nelson, 1993) (**Figure 26**).

La tertiapine a un effet inhibiteur sur l'hétérodimère Girk1/Girk4 avec une forte affinité ($IC_{50} = 8$ nM). Afin d'étudier sa sélectivité sur d'autres canaux potassiques, la tertiapine a été testée sur les sous-unités Kir1.1 et Kir2.1. Alors que la tertiapine n'a pas d'effet significatif sur les canaux Kir2.1, elle a un effet inhibiteur puissant sur les canaux Kir1.1 de rat ($IC_{50} = 2$ nM). Des études complémentaires ont démontré que les canaux Kir3.1/Kir3.2 neuronaux et les canaux BK humains (Slo1, KCa1.1) sont également inhibés par la tertiapine-Q (Kanjhan et al., 2005), une forme synthétique stabilisée de la tertiapine.

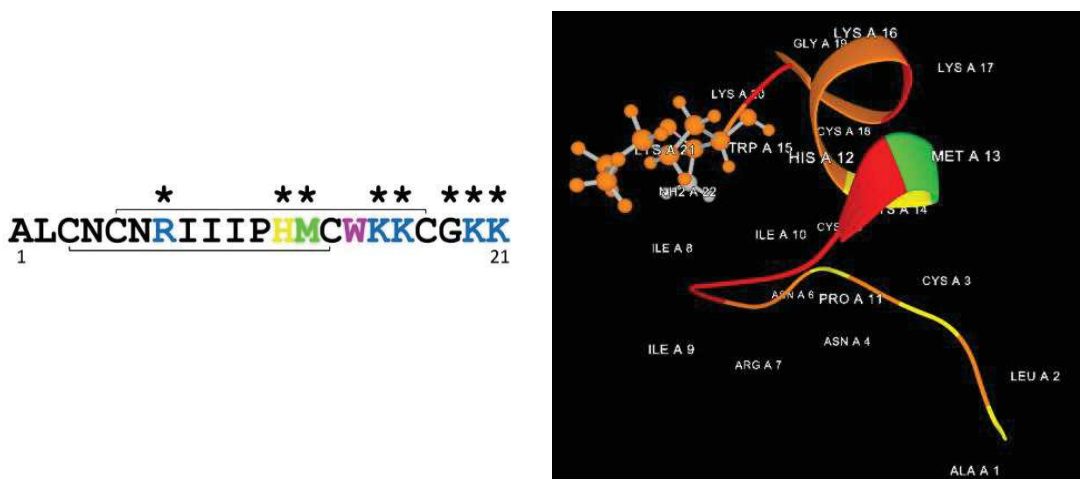


Figure 26 : Ci-dessus : Structure primaire de la tertiapine. La méthionine (M13) est en vert et les acides aminés basiques en bleu. Les * indiquent les résidus impliqués dans le blocage du canal (Doupnik, 2017). A droite : Structure second-tertiaire de la tertiapine (Protein Data Bank in Europe)

Relation structure/ activité

La forte affinité de la tertiapine-Q pour les canaux Girk1 et Girk4-Girk1 a permis d'identifier les acides aminés impliqués dans les interactions entre la tertiapine-Q et les canaux potassiques (Jin et al., 1999 ; Ramu et al., 2001 ; Ramu et al., 2004 ; Ramu et al., 2008)). Ces travaux ont mis en évidence la présence d'une méthionine, en position 13, qui est facilement oxydée par l'air (Jin and Lu, 1999). L'oxydation de cette méthionine diminue l'affinité de la tertiapine pour les canaux Girk1 et Girk4-Girk1 d'un facteur 4 ou 5. La substitution de la M13 par une glutamine (Q) permet de générer un peptide non oxydable et stable qui a un IC_{50} équivalent à la tertiapine sauvage non oxydée. La tertiapine-Q inhibe les canaux Kir1.1 et Girk1 et Girk4-Girk1 avec des IC_{50} respectifs de 1 nM et 13 nM. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé uniquement de la tertiapine-Q.

La séquence primaire de la tertiapine contient 4 résidus cystéine qui forment des ponts disulfures entre les résidus Cys3-Cys14 et Cys5-Cys18. Ces ponts disulfures sont nécessaires au maintien de la structure tertiaire du peptide. La substitution de chacun de ces résidus Cystéine par des alanines met en évidence que ces cystéines contribuent et sont nécessaires à la haute affinité pour l'inhibition des canaux Kir1.1.

Quatre résidus Lysine en position 16,17, 20, 21 forment une interface hautement basique, qui permet des interactions électrostatiques avec le canal. Sur la face opposée de la tertiapine, l'arginine en position 7 permet aussi de former des contacts électrostatiques avec les canaux Kir (**Figure 27**).

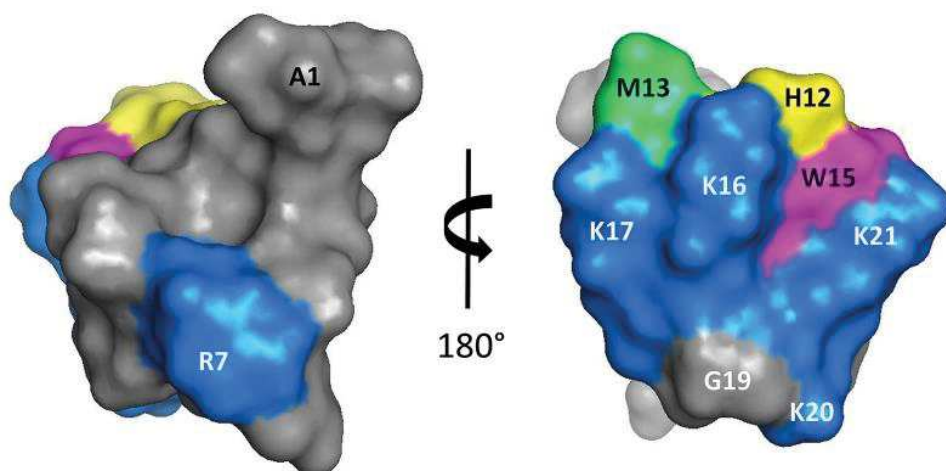


Figure 27 : Structure tertiaire de la tertiapine : la structure tertiaire met en évidence les résidus basiques exposés à la surface, qui permettent l'interaction avec le canal potassique.

Du fait de sa haute affinité et de ses propriétés inhibitrices, la tertiapine-Q est un outil de choix pour la compréhension du rôle physiologique des courants $I_{K_{ACh}}$. L'administration intraveineuse de tertiapine-Q inhibe la fibrillation atriale chez le chien (Hashimoto et al., 2006; Ravens et al., 2013 ; Walsh, 2011).

***OBJECTIFS DE LA
THESE***

En 2014, mon équipe de recherche a montré que l'inactivation génétique du canal *Girk4* permet de corriger les arythmies cardiaques induites par l'inhibition conditionnelle et cœur-spécifique du canal HCN4 (responsable du courant I_f) (Mesirca et al., 2014). La souris *hHCN4-AYA*, porteuse de cette mutation dominante négative au niveau du pore du canal HCN4, ne possède plus de courant I_f . Cette inhibition génétique de la conductance du canal HCN4 induit des altérations de la libération de Ca^{2+} intracellulaire au niveau du nœud sinusal et provoque des troubles sévères et complexes du rythme cardiaque : dysfonctionnement du nœud sinusal, BAV et arythmie ventriculaire (**Figure 28**). Le croisement de cette souris *hHCN4-AYA* avec la souris *Girk4^{-/-}*, dont le gène codant pour le canal K^+ activé par l'acétylcholine (I_{KACH}) a été invalidé, a permis de corriger les troubles de la génération et de conduction (**Figure 28**). Ceci démontre que l'effet de la perte du canal HCN4 peut-être corrigé génétiquement et pharmacologiquement par l'inhibition du canal GIRK4. Cette étude ouvre des perspectives thérapeutiques très prometteuses pour la prise en charge de la bradycardie et des arythmies associées au SSS.

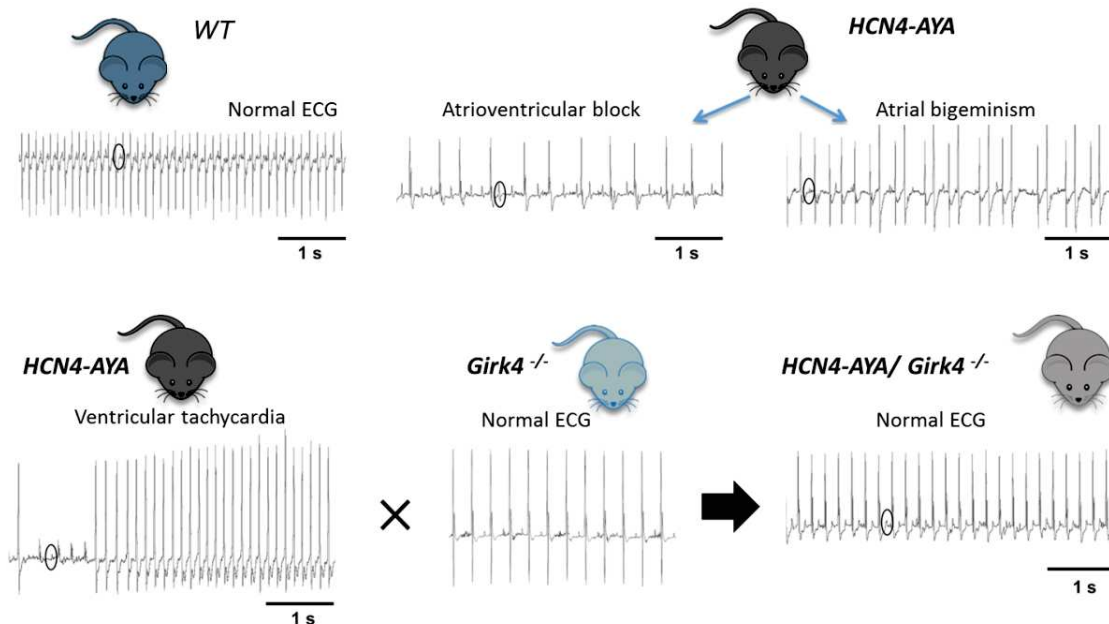


Figure 28 : Electrocardiogrammes des souris *WT*, *HCN4-AYA*, *Girk4^{-/-}* et *HCN4-AYA/Girk4^{-/-}*. D'après (Mesirca et al., 2016a).

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de recherche. L'objectif de ma thèse est de tester si l'inhibition pharmacologique du courant $I_{K_{ACh}}$ peut corriger la bradycardie et les troubles de conduction auriculo-ventriculaire d'origines congénitales. Pour ce faire, j'ai utilisé des approches pharmacologiques et génétiques, ainsi que des souris modèles de SSS.

***MATERIEL ET
METHODES***

6. Modèle murins

Toutes les souris utilisées dans notre équipe sont de fond génétique C57BL/6J et sont élevées en secteur EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) : soit sur le plateau central d'élevage de Montpellier (PCEA), soit sur le



plateau *iExplore* de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF). Les souris sont stabulées à une température constante comprise entre 21 et 22°C. Elles sont soumises à un rythme nyctéméral imposé de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Elles ont un accès, *ad libitum*, à l'eau de boisson et à la nourriture.

Dans le paragraphe qui suit, je vais vous présenter l'ensemble des modèles murins que j'ai utilisé au cours de ma thèse en mettant en évidence leurs caractéristiques principales.

1.1 Souris $Ca_v1.3$ KO ($Ca_v1.3^{-/-}$)

En 2000, l'équipe de Jörg Striessnig (Institut de pharmacologie d'Innsbruck, Autriche) a généré la souris $Ca_v1.3$ KO ($Ca_v1.3^{-/-}$). Pour ce faire, une cassette « néomycine » a été introduite au niveau de l'exon 2 du gène codant pour la sous-unité $Ca_v1.3$. Cette insertion induit la troncature de ce canal calcique de type L avant son premier segment transmembranaire, le rendant ainsi non fonctionnel (Platzer et al., 2000). Cette souris KO constitue un outil de choix pour l'étude du rôle fonctionnel de la sous-unité $Ca_v1.3$ dans la génération de l'activité pacemaker cardiaque et de son implication déterminante dans la dépolarisation diastolique des cellules pacemakers du SAN (Mangoni et al., 2003). D'un point de vue phénotypique, la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présente une surdité congénitale accompagnée de dysfonctions sinusales : bradycardie et arythmie. Le tracé électrocardiographique de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ révèle un allongement et une variabilité importante de son intervalle RR. Il présente également une prolongation de l'intervalle P-R, révélatrice d'un défaut de la conduction auriculo-ventriculaire (**Figure 29**). Des BAV de type 2 sont également détectés sur les ECG.

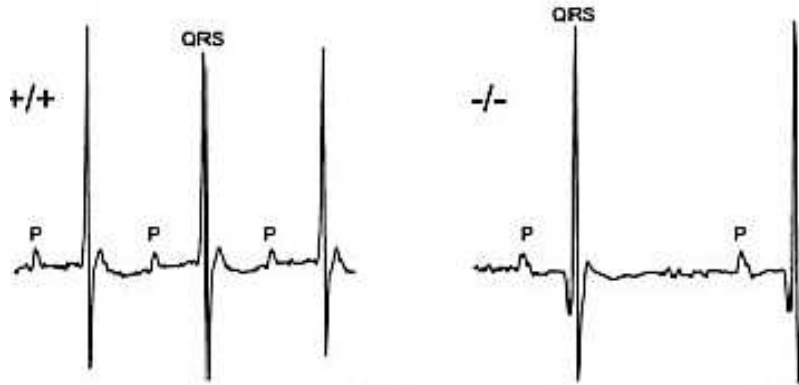


Figure 29: Trace électrocardiographique d'une souris sauvage (WT ; +/+) et d'une souris *Ca_v1.3^{-/-}* (Mangoni et al., 2006a).

En 2011, une nouvelle canalopathie humaine affectant la sous-unité *Ca_v1.3* a été décrite dans deux familles d'origine pakistanaise (Baig et al., 2011). Il s'agit de la SANDD pour « *Sino Atrial Node Dysfunction and Deafness* ». Cette pathologie humaine est caractérisée par une surdité congénitale associée à des troubles sévères de la fonction sinusale. Chez ces individus atteints de surdité, l'insertion d'un résidu « Glycine » a été identifiée dans une région fortement conservée dans les canaux calciques de hauts seuils. Cette mutation, localisée à proximité du pore du canal, dégrade la conductance du canal et altère ses propriétés d'ouverture (**Figure 30**).

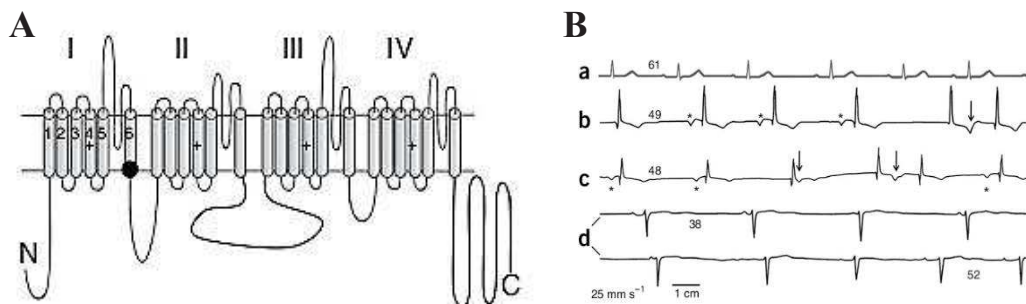


Figure 30 : A. Représentation topologique simplifiée de la sous-unité *Ca_v1.3*. Le rond noir localise la position de l'insertion de la Gly, responsable de la SANDD, entre les résidus 403-404. B. Enregistrement de l'ECG d'un sujet sain (a) et de 3 patients SANDD homozygotes (b- d) pour la mutation de la sous-unité *Ca_v1.3* (D'après (Baig et al., 2011))

L'association de la surdité aux troubles de la fonction sinusale retrouvés chez ces patients ressemble fortement au modèle de souris $Ca_v1.3^{-/-}$. Les mutations induisant le SANDD mettent en évidence que la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ est un très bon modèle pour l'étude du rôle de la sous-unité $Ca_v1.3$ dans la fonction pacemaker cardiaque humaine.

1.2 Souris $Ca_v3.1$ KO ($Ca_v3.1^{-/-}$)

La souris $Ca_v3.1^{-/-}$ a été générée par l'équipe de Shin en 2001 (Kim et al., 2001). C'est l'exon codant pour la partie N-terminale de la sous-unité $Ca_v3.1$ qui est délété chez cette souris. Sa caractérisation phénotypique a mis en évidence que l'inactivation génétique de la sous-unité $Ca_v3.1$ induit un ralentissement significatif de la fréquence cardiaque (10 %) et de la conduction auriculo-ventriculaire. L'inactivation du gène *cacna1g* codant pour cette sous-unité $Ca_v3.1$ de ce canal calcique de type T ralentit l'activité pacemaker des cellules du SAN isolées en réduisant la pente de la dépolarisation diastolique et en agissant sur la conduction au niveau du NAV (Mangoni et al., 2006b).

1.3 Souris double KO $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$)

En croisant les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v3.1^{-/-}$, décrites précédemment, l'équipe de Matteo Mangoni a généré la souris double KO : $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. La perte combinée des canaux calciques $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ a un effet additif sur le ralentissement de la fréquence cardiaque et sur la prolongation de la conduction auriculo-ventriculaire (**Figure 31**). L'intervalle PR enregistré chez les souris double KO est plus long que celui des souris KO pour un unique canal calcique. Des BAV, caractérisés par la présence de plusieurs onde P consécutives non suivies de complexe QRS, sont également présents (Marger et al., 2011a).

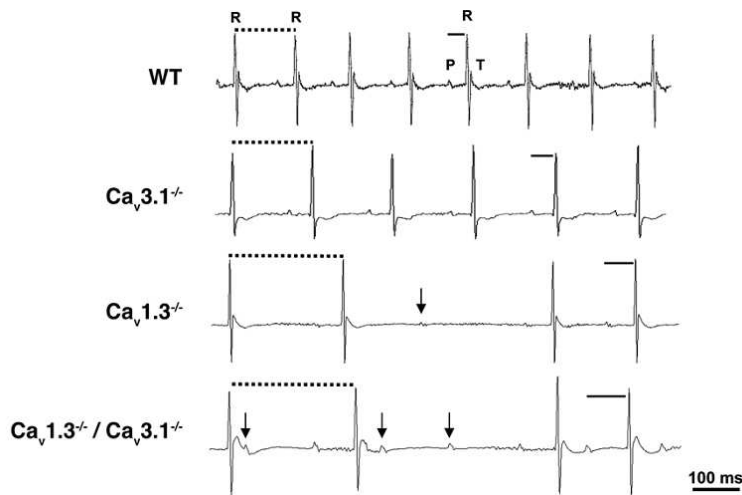


Figure 31 : Tracés électrocardiographiques de souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v3.1^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. D'après (Marger et al., 2011a)

Ces souris possèdent un phénotype similaire aux humains atteints de bloc de conduction cardiaque congénital (*Congenital Heart Block*, CHB). Les jeunes patients atteints de CHB présentent une bradycardie accompagnée de troubles de la conduction caractérisés par des BAV. CHB affecte les fœtus et/ou les nouveau-nés dont les mères développent des auto-anticorps. L'application d'IgG, provenant des mères ayant des enfants atteints de CHB, sur des SAN de jeunes lapereaux provoque une double inhibition des courants $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ ainsi que de la bradycardie sinusale. A contrario, l'application sur les SAN de jeunes lapins d'IgG, prélevés chez des mères ayant des enfants en bonne santé, n'affecte pas les courants ioniques et la génération des potentiels d'action. Ces résultats mettent en évidence l'effet des IgG maternels sur l'inhibition des courants $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ et le développement de la bradycardie observée dans CHB. Ces découvertes peuvent avoir une relevance clinique en suggérant que la bradycardie sinusale peut devenir un marqueur potentiel de la détection et de la prévention de CHB (Hu et al., 2004).

1.4 Souris Girk4 KO ($Girk4^{-/-}$)

Afin de comprendre le rôle du courant I_{KACH} dans la régulation du rythme cardiaque, l'équipe de David Clapham a généré une souris KO pour l'isoforme Girk4 du canal potassique activé par la G protéine (Wickman et al., 1998). D'un point de vue phénotypique, cette souris possède une légère augmentation de la fréquence cardiaque de base. La souris $Girk4^{-/-}$ a permis de mettre en évidence que le courant I_{KACH} contribue,

à hauteur de 50 %, à la bradycardie déclenchée par une stimulation vagale ou par l'administration d'adénosine. Les souris *Girk4*^{-/-} sont incapables d'ajuster leur fréquence cardiaque en un laps de temps bref (< à 2 s). *I_{KACH}* est donc un effecteur critique de la voie parasympathique pour la régulation de la fréquence cardiaque (Mesirca et al., 2013).

1.5 Souris double KO *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-}

Cette lignée murine a été générée par l'équipe de Matteo Mangoni en croisant les souris *Ca_v1.3*^{-/-} et la souris *Girk4*^{-/-} (Mesirca et al., 2016b) précédemment décrites.

La souris issue de ce croisement met en évidence que l'invalidation génétique du canal *Girk 4* chez la souris *Ca_v1.3*^{-/-} corrige les dysfonctions sinusales, prévient l'apparition de tachy-bradycardie et normalise la conduction auriculo-ventriculaire des souris *Ca_v1.3*^{-/-}. Cette approche génétique compensatoire peut représenter un paradigme nouveau pour la correction des défauts sinusaux en agissant sur la balance entre les courants entrants et sortants de la cellule pacemaker.

1.6 Souris HCN4-CNBD

Afin de pouvoir élucider le rôle de l'AMPC dans la régulation des canaux HCN4 du SAN, l'équipe de Dirk Isbrandt a généré la souris HCN4-CNBD dont le canal HCN4 est porteur de la mutation hHCN4 -573X (Alig et al., 2009). Cette mutation est une substitution du résidu en position 573 en un codon stop, qui provoque la délétion du domaine COOH-terminal de HCN4 et la perte du domaine de liaison de l'AMPC (domaine CNBD pour Cyclic Nucleotide-Binding Domain) situé dans cette région (**Figure 32**).

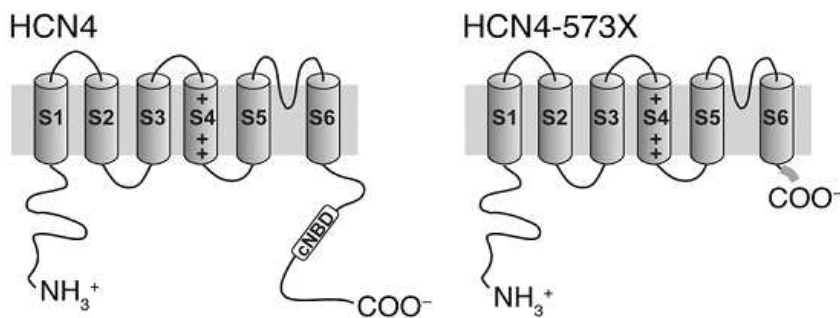


Figure 32 : Représentation schématique de la topologie du canal HCN4 avec ses 6 segments transmembranaires (S1 à S6), ses domaines N et C terminaux. La mutation HCN4-573X induit l'insertion d'un codon stop, provoquant la perte du domaine C-terminal où est situé le domaine de liaison de l'AMPc : domaine CNBD (Schulze-Bahr et al., 2003).

Chez la souris HCN4-CNBD, l'expression du canal muté est inductible (système Tet Off sous contrôle de la doxycycline) et cœur spécifique (promoteur MHCA de la chaîne lourde de la myosine). Chez la souris HCN4-CNBD, la mutation hHCN4 –573X entraîne une réduction notable de la fréquence cardiaque tant au repos et que pendant l'exercice physique. Chez l'humain, une mutation a été identifiée chez une patiente atteinte de dysfonction sinusale, s'exprimant par une bradycardie sévère et accompagnée d'épisodes intermittents de fibrillation atriale. Cette mutation est la délétion d'une paire de base (1631delC) située dans l'exon 5 du gène codant pour HCN4 (Schulze-Bahr et al., 2003).

1.7 Souris Scn5a^{+/-} (Na_v1.5^{+/-})

Un modèle de souris dont le gène *Scn5a* codant pour le canal Na⁺ cardiaque Na_v1.5 a été invalidé a été développé en 2002 (Papadatos et al., 2002). La perte du canal sodique codé par le gène *Scn5a* induit de très sérieux défauts au cours de la morphogénèse ventriculaire provoquant la létalité intra-utérine des souris homozygotes KO. En revanche, les souris Scn5a hétérozygotes survivent normalement. Les cœurs des souris Scn5a^{+/-} présentent de nombreux défauts dont une altération de la conduction auriculo-ventriculaire, un retardement de la conduction intra-myocardique, une augmentation de la période réfractaire ventriculaire et une tachycardie ventriculaire. En vieillissant, les souris Scn5a^{+/-} développent des troubles de la conduction de plus en plus marqués. Ces troubles

s'accompagnent du développement d'une fibrose ventriculaire (Leoni et al., 2010; Royer et al., 2005). Les souris $Scn5a^{+/-}$ constituent un modèle d'étude de choix pour l'étude du syndrome de Brugada et pour les troubles progressifs de la conduction cardiaque, telle que la maladie de Lenègre. Les enregistrements télémétriques réalisés sur ces souris $Scn5a^{-/-}$ ont été réalisés à l'institut du Thorax de Nantes, en collaboration avec le Dr Flavien Charpentier et son équipe. A la différence de toutes les autres souris utilisées dans cette étude, les souris $Scn5a^{+/-}$ sont de fond génétique SV140.

1.8 Souris WT

Les souris sauvages ou WT que j'ai utilisées au cours de ma thèse proviennent soit des élevages commerciaux (Janvier Laboratory et Charles River), soit des souris $^{+/+}$ issues de l'élevage de nos propres lignées.

7. Enregistrement télémétrique des ECG *in vivo*

L'enregistrement, en continu, des ECG est réalisé sur les souris vigiles grâce au système de télémétrie développé par la société *Data Sciences International* (St.Paul, MN, USA) (**Figure 33**). Le principe de cette technique consiste à capturer les signaux télémétriques émis entre le transmetteur (implanté dans la souris en sous-cutané) et la plaque réceptrice (située sous la cage de la souris). Le signal télémétrique analogique du transmetteur est enregistré et converti en signal digital par le système d'acquisition pour pouvoir être lu et analysé sur le logiciel Dataquest A.R.T. Les signaux sont enregistrés, en continu, à la fréquence d'échantillonnage de 2000 Hz. Les électrocardiogrammes obtenus sont ensuite analysés avec des logiciels spécifiques : ECG auto 1.5.7 (EMKA technologie, Paris, France) et/ou Ponemah 5.20-SP7 (DSI, St-Paul, NM, USA).

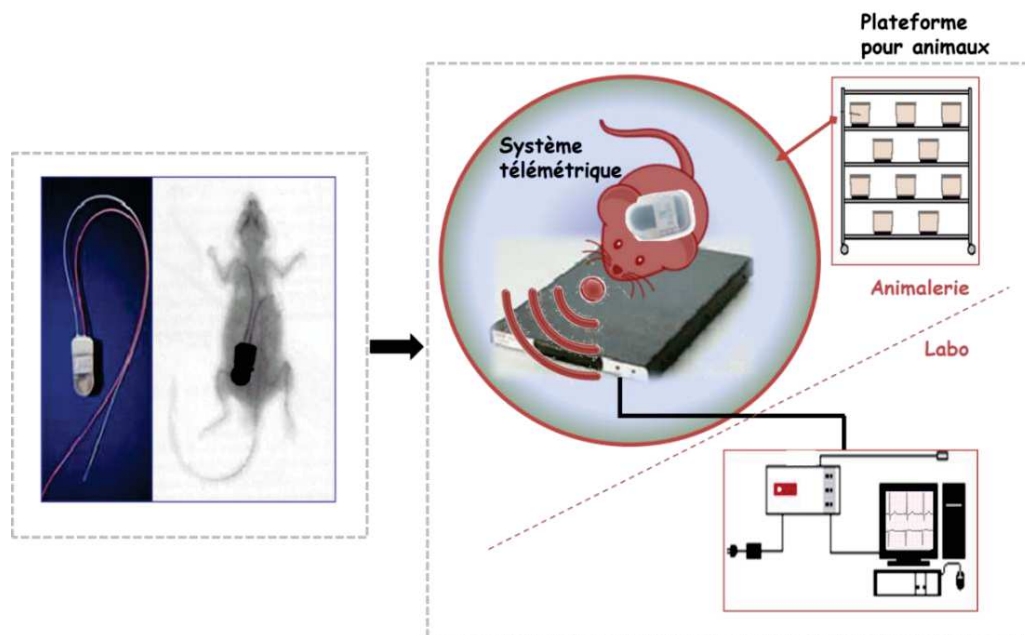


Figure 33 : *Enregistrement des électrocardiogrammes in vivo par télémétrie.* A gauche, une photographie du transmetteur et une radiographie d'une souris implantée avec ce transmetteur. A droite, une schématisation du système d'acquisition du signal télémétrique : la souris implantée avec un transmetteur est placée sur une plaque réceptrice. Les signaux télémétriques émis sont convertis puis transmis à l'ordinateur.

2.1 Implantation des transmetteurs en sous-cutané

Nous utilisons des sondes télémétriques de type ETAF10, pesant 1,6 grammes. Compte tenu du poids de ce transmetteur, les souris à implanter doivent peser au minimum 17 grammes.

2.1.1 Anesthésie

La souris est anesthésiée à l'isoflurane dans une 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 endormie, 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 entre 2 et 1,5 %. Pendant toute la durée de l'intervention, la souris est maintenue sous une lampe chauffante, afin de prévenir l'hypothermie.

2.1.2 Protocole chirurgical

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 10 %. Une solution de lidocaïne (4 mg/kg) est administrée localement sur les tissus avant leur incision. Une incision longitudinale (< 1,5 cm) est pratiquée dans le dos de la souris. Deux petites incisions transversales (< 3 mm) sont réalisées sur sa face ventrale : une au niveau sous sternal gauche, la seconde sous la clavicule droite. Ces incisions permettent le positionnement des fils du transmetteur selon la dérivation D2 de l'ECG. Les adhérences entre la peau et le tissu conjonctif sous-cutané sont sectionnées à l'aide d'un ciseau à bouts ronds. Les deux fils du transmetteur sont acheminés du dos vers le thorax de la souris, en sous cutané. L'un est ressorti au niveau de l'incision sous sternale, le second au niveau de l'incision située 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 sous-jacent. Il faut vérifier que la partie dénudée de l'électrode est en contact direct avec le muscle. Les incisions cutanées sont ensuite suturées (2 à 3 points). Le transmetteur ECG, traité auparavant dans une solution désinfectante (Stéranios®20) puis soigneusement rincé à l'eau, est introduit dorsalement en sous cutané. Avant la fermeture des incisions cutanées, de la lidocaïne (4 mg/kg) est appliquée localement sur les plans cutanés et sous-cutanés. Après la fermeture des incisions, nous appliquons de la Bétadine® dermique à 10 % sur les sutures et sur la peau environnante.

2.1.3 Suivi péri-opératoire

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), sous apport d'O₂.

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

Au cours des 5 jours suivants l'intervention, les souris sont pesées quotidiennement et la bonne cicatrisation des sutures est surveillée étroitement. Si la souris récupère normalement de la chirurgie (respiration autonome et normale ; diurèse normale, reprise de l'activité, toilette, ...), elle est incluse dans le protocole expérimental. Dans le cas où la souris présente un signe de souffrance, que sa respiration est difficile, où qu'une perte de poids importante est constatée, l'euthanasie est pratiquée par dislocation cervicale, après administration d'une dose d'anesthésique.

Les premiers enregistrements électrocardiographiques sont réalisés entre 10 et 15 jours après la pose du transmetteur ECG.

2.1.4 Enregistrement des ECG

La température de la pièce est contrôlée entre 21 et 22°C. La souris étant un animal nocturne, l'éclairage de la pièce de télémétrie est en cycle lumineux inversé afin de pouvoir réaliser les expérimentations pendant la phase d'activité des souris : noir de 8h30 à 20h30 ; lumière de 20h30 à 8h30.

Chaque série d'enregistrement débute par un enregistrement de l'ECG durant 24 heures. Ceci permet de déterminer la fréquence cardiaque basale de chaque souris et de repérer sa fréquence cardiaque pendant les 12 heures de lumière (phase de repos) et les 12 heures d'obscurité (phase d'activité).

Pour les différentes injections de molécules pharmacologiques, l'ECG basal est enregistré pendant environ quatre heures avant l'injection. L'effet sur la fréquence cardiaque de la molécule administrée est suivi pendant environ cinq heures après son injection. Toutes les injections sont pratiquées par voie intra-péritonéale (0,5 ml). Les différentes injections sont distantes de 48 heures.

Solutions injectées :

- NaCl : 0,9 g pour 100 (Lavoisier, France)
- Tertiapine-Q : 0,1-1-5 mg/kg (Alomone, Israel et Smartox, France)
- Atropine : 0,5 mg/kg (Aguettant, France)

2.2 Analyse des électrocardiogrammes *in vivo*

2.2.1 Description rapide des électrocardiogrammes

Le cheminement de l'onde d'excitation depuis son émission par le nœud sinusal jusqu'aux dernières portions du muscle ventriculaire explique la succession et la morphologie normale des ondes de l'électrocardiogramme (ECG) (**Figure 34**).

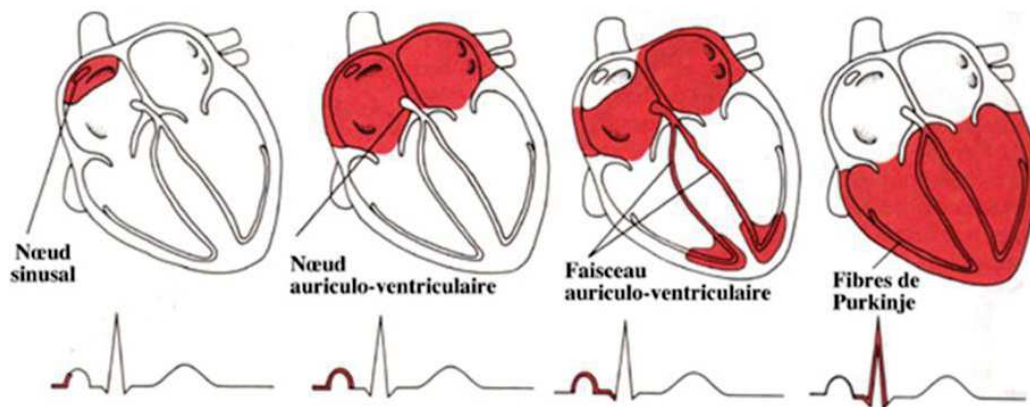
- ❖ **L'onde P** correspond à la dépolarisation des oreillettes. Une fois que l'influx électrique s'est propagé, l'oreillette gauche se dépolarise.

- ❖ **L'intervalle P-R** correspond à la conduction auriculo-ventriculaire. L'onde de dépolarisation se propage à travers le NAV pour arriver dans le tissu des ventricules. Le faisceau de His et les fibres de Purkinje assurent la conduction avec beaucoup d'efficacité. L'intervalle P-R est un bon indicateur de conduction auriculo-ventriculaire. Son allongement peut prédire des phénomènes de BAV (Chung, Hwang et al, 2016).

- ❖ **Le complexe QRS** correspond à la durée de dépolarisation des ventricules. Sa durée est courte, grâce à la propagation rapide à travers le faisceau de His et les fibres de Purkinje.

- ❖ **L'intervalle QT** correspond à l'activité ventriculaire, comprenant une partie de la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire.

- ❖ **L'onde T** représente la phase finale de la repolarisation ventriculaire, phase dite rapide et efficace, les myocytes retrouvant leur charge interne de repos.



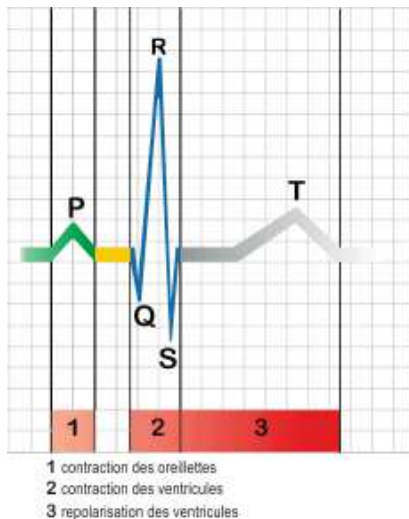


Figure 34 : ECG normal. L'onde P correspond à l'excitation auriculaire et au remplissage des oreillettes. L'intervalle PQ correspond au temps de conduction de l'impulsion sinusal au nœud auriculo-ventriculaire. Le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules. L'onde T correspond à la repolarisation des ventricules.

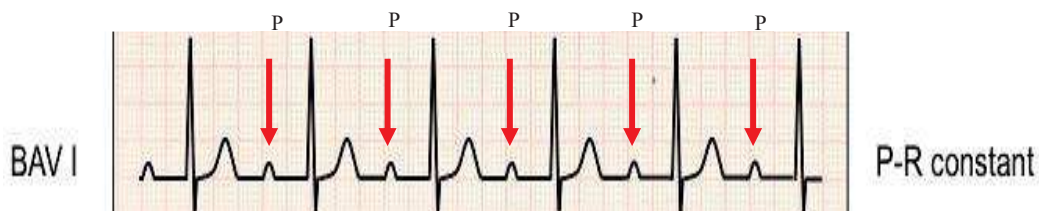
2.2.2 Cas particulier des BAV sur les tracés ECG

Comme nous l'avons vu précédemment, en situation normale, l'influx naît de l'automatisme du nœud sinusal, il parvient au nœud auriculo-ventriculaire où il subit un ralentissement. Il se diffuse ensuite aux ventricules par le tronc du faisceau de His, lequel se divise rapidement en deux branches (droite et gauche) destinées à chaque ventricule.

Dans certaines situations pathologiques, la transmission de l'influx électrique des oreillettes vers les ventricules peut être ralentie ou interrompue partiellement ou complètement. Il s'agit de BAV.

Selon leur gravité, les BAV sont classés en trois degrés :

Dans le bloc auriculo-ventriculaire du premier degré, la conduction électrique aux ventricules est retardée mais reste de ratio 1:1. Cela signifie que toutes les impulsions électriques issues des oreillettes atteignent les ventricules, mais chacune d'entre elles est ralentie d'une fraction de seconde lors de son passage à travers le nœud auriculo-ventriculaire. Sur l'ECG, toutes les ondes P sont suivies de complexes QRS. Mais un allongement de l'intervalle P-R est mesuré.

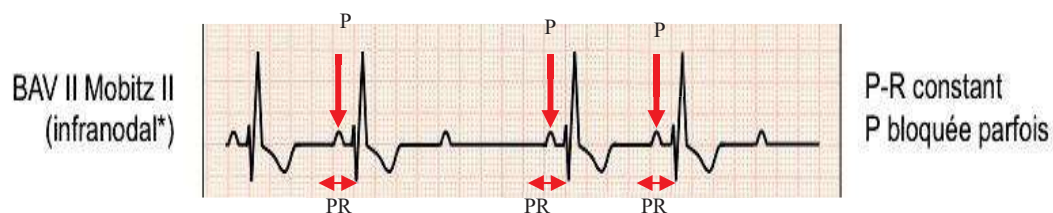


Dans le BAV de deuxième degré, la conduction électrique est bloquée de façon intermittente. Seules certaines impulsions électriques atteignent les ventricules. Sur le tracé électrocardiographique, certaines ondes P normales sont suivies par des complexes QRS alors que d'autres pas. Différents types de BAV de second degré existent.

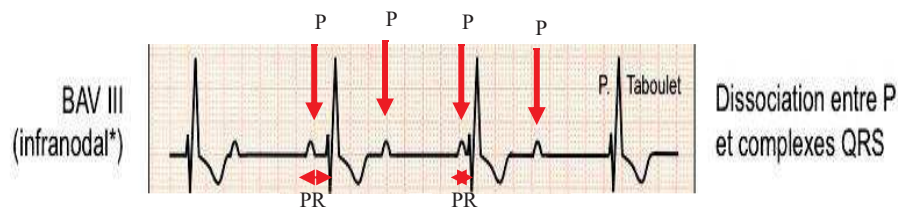
- ❖ Dans le BAV de second degré de **type Mobitz I**, l'intervalle PR s'allonge progressivement à chaque battement jusqu'à ce que l'impulsion auriculaire ne soit plus conduite. La conduction nodale auriculo-ventriculaire normale (PR normal) reprend au battement suivant et la séquence est répétée.



- ❖ Dans le BAV de second degré **de type Mobitz II** l'intervalle PR reste constant. Par intermittence, les battements ne sont pas conduits et les complexes QRS disparaissent. En général, suivant un cycle de BAV à la 3^e ou 4^e onde P.



Dans le BAV du troisième degré, la conduction électrique entre les oreillettes et les ventricules est complètement bloquée. Il n'y a aucune relation entre les ondes P et les complexes QRS (dissociation auriculo-ventriculaire). La fonction cardiaque est maintenue par un rythme d'échappement jonctionnel ou ventriculaire, plus lentes et moins fiables et des symptômes plus sévères.



2.2.3 Méthode d'analyse des ECG

Pour analyser les ECG enregistrés, par télémetrie, j'ai utilisé les logiciels ECG auto 1.5.7 (EMKA technologie, Paris, France) et Ponemah 5.20-SP7 (DSI, St-Paul, NM, USA).

Sur les tracés ECG, j'ai pris en compte l'intervalle RR qui permet de déterminer le HR. Le HR, exprimé en battements par minutes (bpm), est obtenu en divisant le RR par 60000. J'ai également compté manuellement les arythmies et plus spécialement les BAV de premier et de second degré.

8. Analyse statistique

Les évaluations statistiques sont réalisées avec le logiciel Prism 7 (GraphPad, Inc). Les résultats sont représentés sous leur valeur moyenne +/- SEM (« *standard error of the mean* », erreur type de la moyenne). Les tests statistiques sont utilisés de la manière la plus appropriée et spécifiés pour chaque figure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$.

RESULTATS

Pour commencer, nous avons enregistré les électrocardiogrammes des différents génotypes de souris présentant un profil arythmique afin d'évaluer la dysfonction sinusale et la conduction auriculo-ventriculaire. Pour cela, nous avons mesuré la fréquence cardiaque et l'intervalle PR.

Ensuite, sur ces modèles murins, nous avons étudié et comparé l'amplitude et la durée de l'effet de l'injection de tertiapine-Q et de l'atropine. L'atropine, antagoniste des récepteurs muscariniques M2, est utilisée en clinique pour traiter les cas de dysfonctions sinusales aïgus, qui sont généralement réversibles.

L'ensemble de mes résultats sont décrits dans le chapitre qui suit. Nous avons rassemblé l'ensemble des données numériques, pour chaque paramètre mesuré et chaque génotype de souris, dans les tables de l'annexe 1.

-1-

Injection de la tertiapine-Q

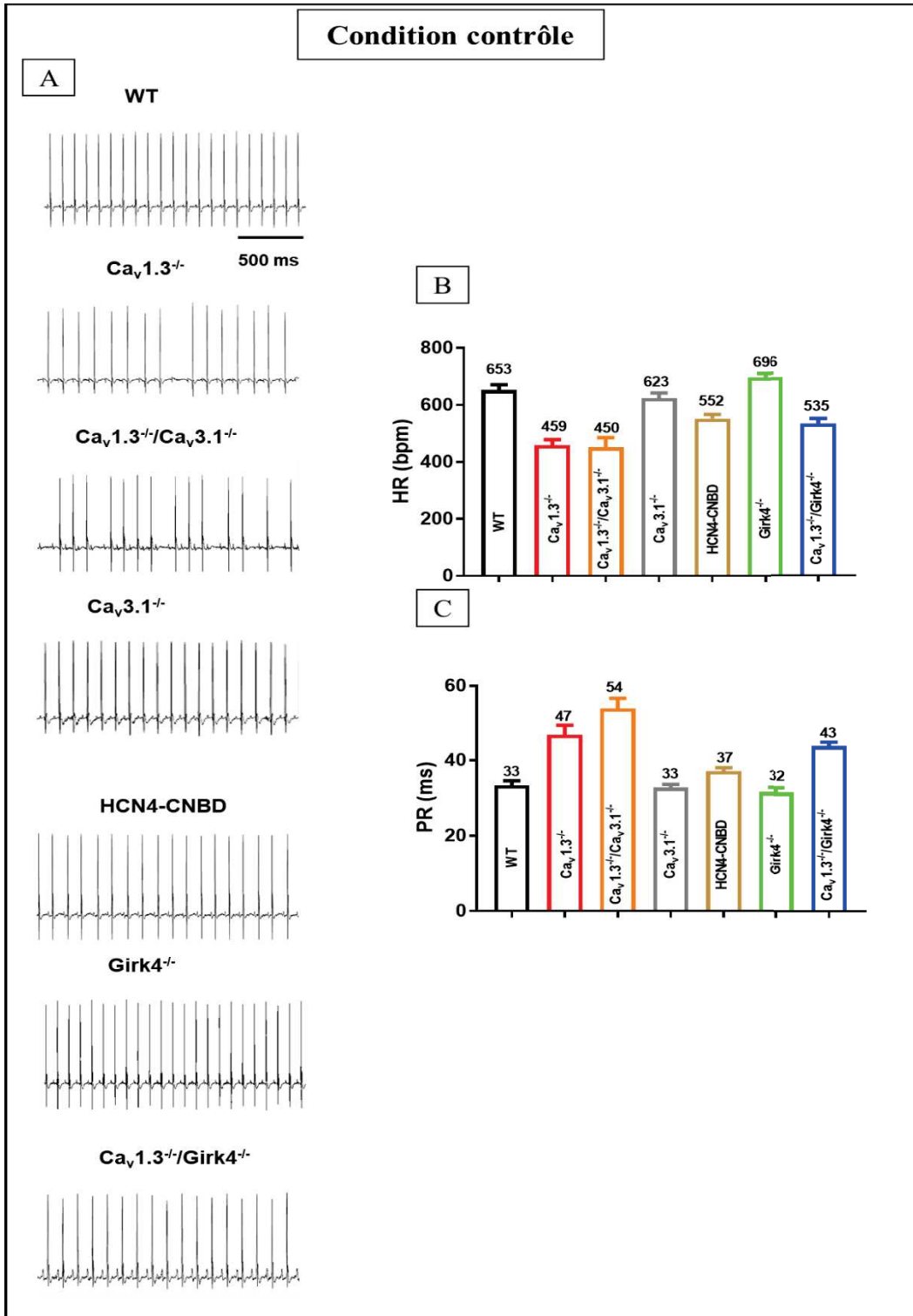


Figure 35 : Données électrocardiographiques des différents modèles murins utilisés dans cette étude en condition contrôlée. A : Electrocardiogrammes des différents génotypes (WT n=10, Ca_v1.3^{-/-} n=10, Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-} n=11, Ca_v3.1^{-/-} n=9, HCN4-CNBD n=9, Girk4^{-/-} n=6, Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-} n=6) ; **B et C :** Histogrammes représentant les valeurs du HR (B) et de l'intervalle PR (C) pour chaque génotype.

Les ECG enregistrés en télémétrie *in vivo* mettent en évidence une bradycardie sinusale chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (de 30 %), $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (de 31 %), $Ca_v3.1^{-/-}$ (de 5 %), HCN4-CNBD (de 16 %) par rapport aux souris WT (**Figure 35B**). La bradycardie sinusale est un signe de SSS. De plus, la conduction auriculo-ventriculaire, représentée par l'intervalle PR, est allongée pour chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, HCN4-CNBD et $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ par rapport au WT (**Figure 35C**). En plus de l'allongement de l'intervalle PR, les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ présentent des BAV. L'ablation génétique de $Ca_v1.3$ provoque ainsi des défauts de conduction (**Figure 35A**). Les souris $Girk4^{-/-}$ montrent une légère tachycardie (7 %). Leur conduction est similaire à celle mesurée chez les souris WT. Nous pouvons observer que les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ présentent un phénotype intermédiaire entre les souris WT et les souris $Ca_v1.3^{-/-}$. Ceci montre que la perte du canal $Girk4$ permet de compenser en partie les effets de la perte de la sous-unité $Ca_v1.3$: notion de sauvetage (*rescuing*) des dysfonctions sinusales.

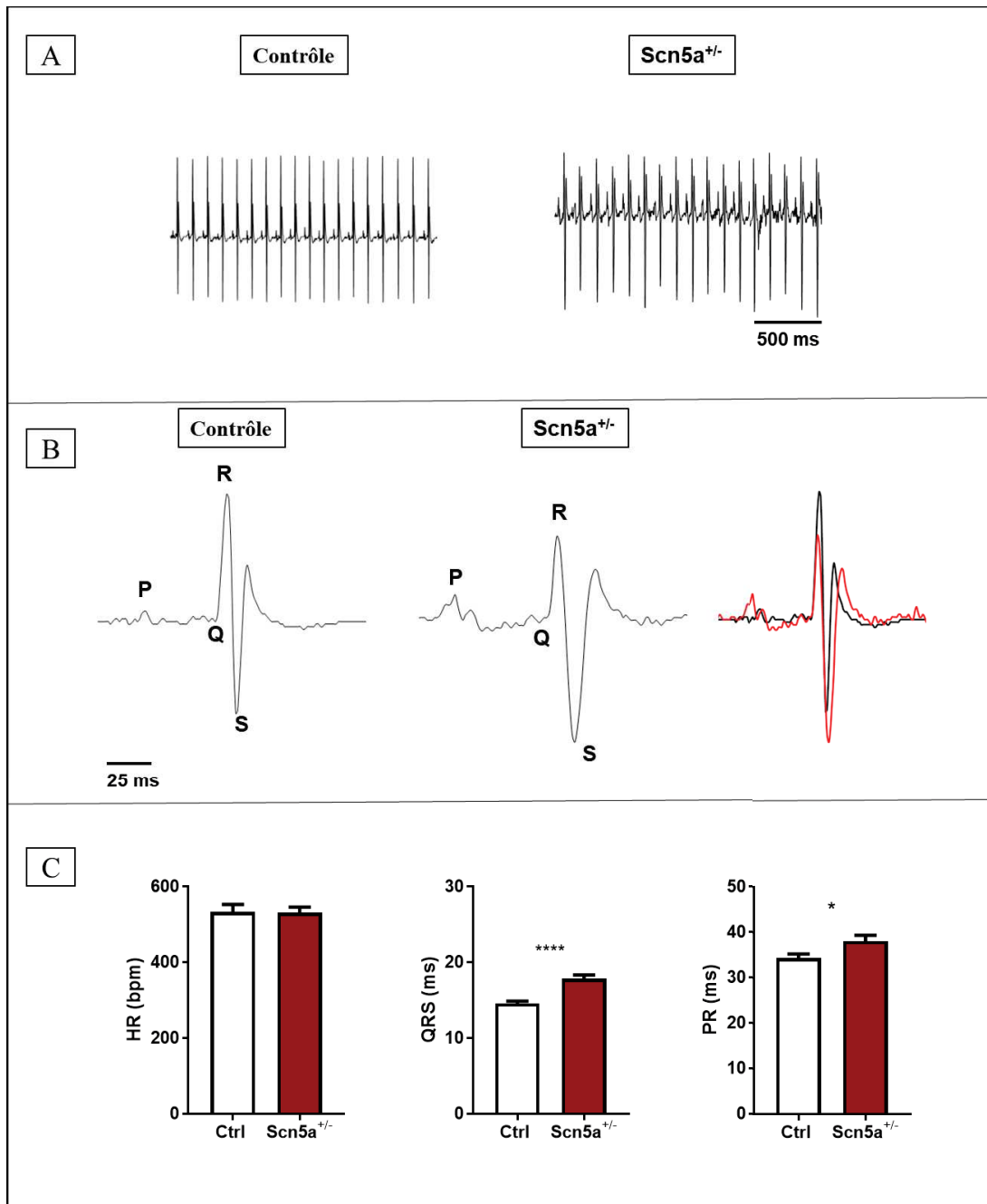


Figure 36 : Données électrocardiographiques des souris $Scn5a^{+/-}$ en condition contrôle. *A* : Electrocardiogrammes d'une souris WT (Gauche) et d'une souris $Scn5a^{+/-}$ (Droite) ; *B* : Traces ECG souris WT (Gauche) et $Scn5a^{+/-}$ (Centre) ; (Droite) Superposition des traces ECG WT et $Scn5a^{+/-}$; *C* : Histogrammes montrant les valeurs du HR (Gauche), des intervalles QRS (Centre) et PR (Droite) chez les souris WT (barre blanche) et $Scn5a^{+/-}$ (barre noire) (WT n=11, $Scn5a^{+/-}$ =16), statistique: unpaired t-test.

Ensuite, nous avons mesuré, par télémetrie, la fréquence cardiaque et la conduction auriculo-ventriculaire chez un autre modèle murin : les souris *Scn5a*^{+/-}. Par rapport aux souris WT, ces animaux ont une fréquence cardiaque normale sans signe de dysfonction du nœud sinusal (**Figure 36A**). Visuellement, les traces ECG des souris WT et *Scn5a*^{+/-} semblent identiques. Toutefois, lorsque nous superposons les ECG de ces deux souris, nous pouvons constater que les souris *Scn5a*^{+/-} présentent des intervalles plus longs du PR (22%) et du QRS (11%), (**Figure 36B et C**). Cela confirme que cette lignée de souris possède un phénotype qui mime la maladie de Lenègre. Il faut noter que les souris WT et *Scn5a*^{+/-} utilisées pour ces expériences sont de fond génétique SV140 alors que les souris utilisées pour l'ensemble des autres génotypes sont sur fond C57B6J.

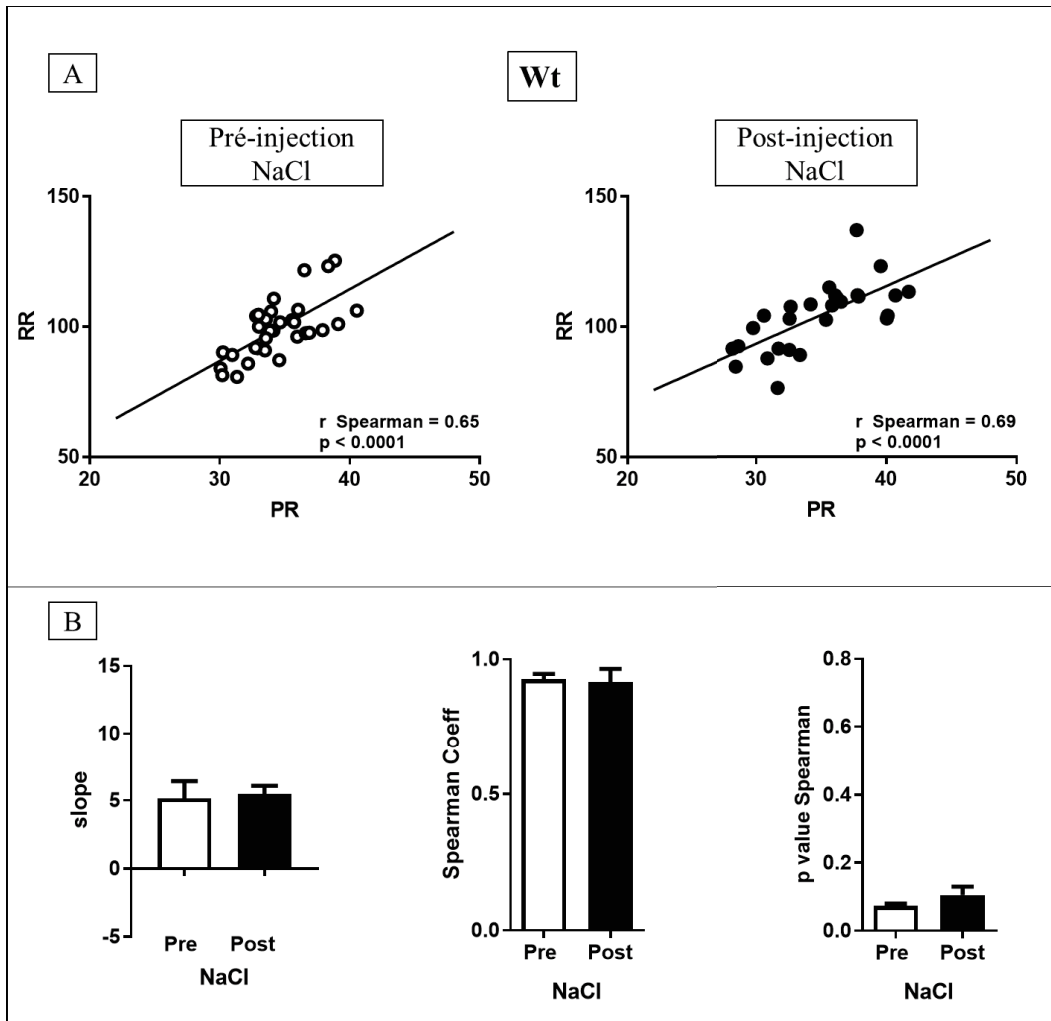


Figure 37 : Analyse de la conduction cardiaque des souris WT avant et après injection de NaCl.

A : Graphique de la corrélation entre les intervalles PR et RR chez les souris WT avec la courbe de régression linéaire avant (Gauche) ($n=32$) et après (Droite) ($n=27$) l'injection de NaCl, statistique: Spearman correlation ; **B :** (Gauche) Histogramme représentant la pente de la droite de régression RR/PR pour chaque souris avant ($n=7$) et après ($n=6$) l'injection de NaCl ; Histogramme montrant les moyennes des coefficients de corrélation de Spearman, (Centre) et les valeurs p relatives (Droite) calculées pour chaque souris avant ($n=7$) et après ($n=6$) injection de NaCl, statistique: Mann-Whitney test et Spearman correlation.

En condition physiologique, une accélération de la fréquence cardiaque (RR) entraîne un raccourcissement de l'intervalle de conduction (PR). La corrélation entre ces deux intervalles est le signe d'une conduction auriculo-ventriculaire normale. En revanche, la perte de cette corrélation constitue un indice de dysfonction de la conduction. Au cours de notre étude, nous avons analysé s'il existe une corrélation entre les intervalles RR et PR chez les différents génotypes, en présence ou non de tertiapine-Q. Pour cela, nous avons utilisé le test de coefficient de corrélation de rang de Spearman. Comme attendu, chez les souris WT, il existe une corrélation linéaire positive entre les intervalles PR et RR indiqué par une p-value de la corrélation de Spearman hautement significative, tant avant qu'après l'injection de NaCl (**Figure 37A**). En effet, le PR et le RR évoluent dans le même sens c'est-à-dire qu'une augmentation du PR entraîne une augmentation du RR. La pente, le coefficient de corrélation de Spearman et la p-value avant et après injection de NaCl ne sont pas statistiquement différents (**Figure 37B**).

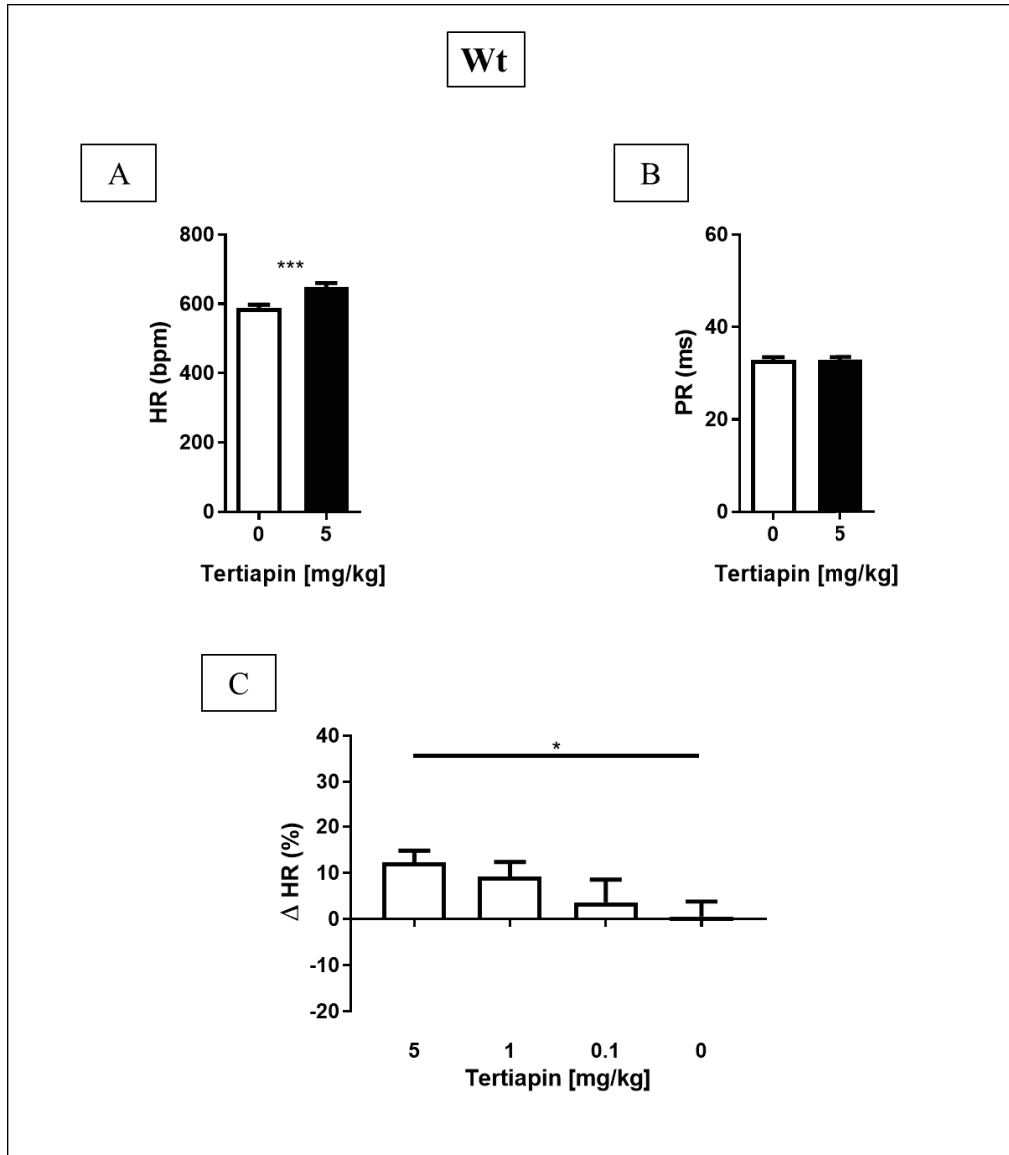


Figure 38 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris WT.

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=19), statistique: paired t-test; **C** : Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée (n=10 pour 0 mg/kg, n=5 pour 0.1 mg/kg ; n=12 pour 1 mg/kg ; n=19 pour 5 mg/kg), statistique: Kruskal Wallis test.

Nous observons que la tertiapine-Q provoque une augmentation statistiquement significative de la fréquence cardiaque (**Figure 38A**), sans modifier la durée de l'intervalle PR (**Figure 38B**). L'effet de la tertiapine-Q sur l'augmentation du HR est dose-dépendant. En effet, l'injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q induit une augmentation de 12 % du HR, alors que la hausse de la fréquence est de 9 % suite à l'injection de 1 mg/kg et de 4 % pour 0,1 mg/kg (**Figure 38C**). Ceci met en évidence l'existence d'une activation basale d' I_{KACH} qui réduit modérément la fréquence cardiaque au repos.

Ca_v1.3^{-/-}

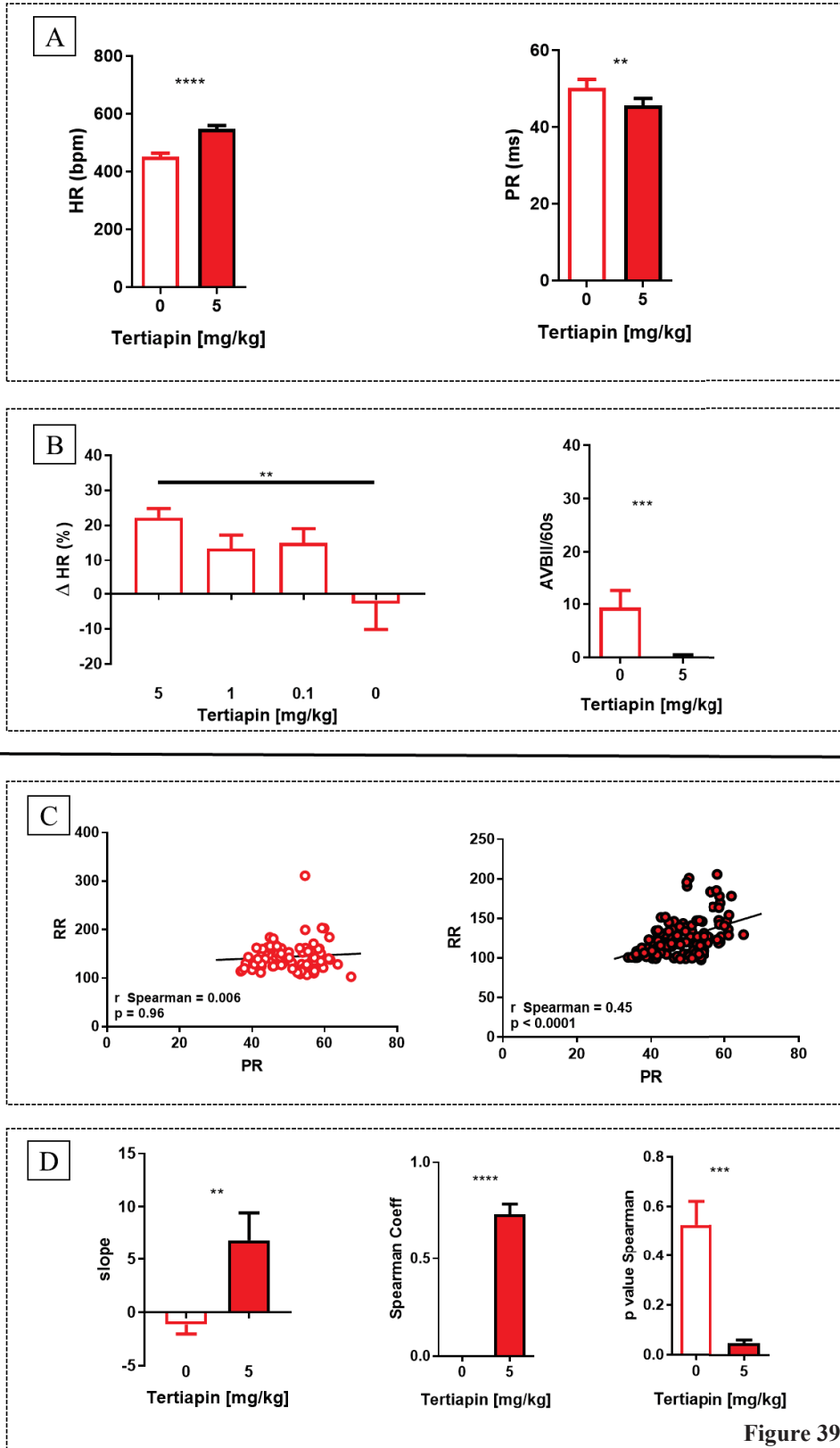


Figure 39

Figure 39 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$.

A : Histogrammes présentant les valeurs du HR et l'intervalle PR avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=15), statistique: paired t-test ; **B :** (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée (n=11 pour 0 mg/kg, n=13 pour 0.1mg/kg, n=15 pour 1mg/mg, n=15 pour 5 mg/kg). (Droite) Histogramme présentant le nombre de BAV/minute avant et après l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=15), statistique: Kruskal Wallis test et Wilcoxon test ; **C :** Graphique de la corrélation entre les intervalles PR et RR chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ avec la courbe de régression linéaire avant (Gauche) (n=83) et après (Droite) (n=137) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg), statistique: Spearman correlation ; **D :** (Gauche) Histogramme représentant la pente de la droite de régression RR/PR pour chaque souris avant et après l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=13) ; Histogramme montrant les moyennes des coefficients de corrélation de Spearman, (Centre) et les valeurs p relatives (Droite) calculées pour chaque souris avant et après injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=13), statistique: Mann-Whitney test et Spearman correlation.

Chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, l'injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q entraîne une augmentation du HR (21 %) et une diminution de la durée de l'intervalle PR (9 %) (**Figure 39A**). La tertiapine-Q agit de manière dose-dépendante sur l'augmentation de la fréquence cardiaque. L'amplitude de cet effet est maximale suite à l'injection de 5 mg/kg alors qu'elle est de 13 % à la dose de 1 mg/kg et de 15 % à 0,1 m/kg (**Figure 39B**). La tertiapine-Q réduit, également, très significativement le nombre de BAV/minute (97% à 5 mg/kg) (**Figure 39B**). Chez ces souris, il n'y a pas de corrélation entre les intervalles PR et RR comme indiqué par le coefficient de corrélation de rang de Spearman de 0,006 et la valeur relative de p de 0,96. L'injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q établit une corrélation linéaire positive ($r_{\text{Spearman}} = 0,45$; $p < 0,0001$) (**Figure 39C**). La **figure 39D** (gauche) représente la pente de la droite de régression linéaire calculée pour chaque souris avant et après injection de tertiapine-Q. La pente est nulle voir négative avant l'injection ; elle devient significativement importante après l'injection de la tertiapine-Q. De plus, le coefficient de Spearman est significativement augmenté (**Figure 39D** centre et droite) par l'injection de tertiapine-Q ce qui suggère une augmentation de la corrélation entre ces deux paramètres. Ceci correspond à ce qui est observé chez les souris WT. L'ensemble de ces observations mettent en évidence que la tertiapine-Q corrige la bradycardie et restaure la conduction auriculo-ventriculaire chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$.

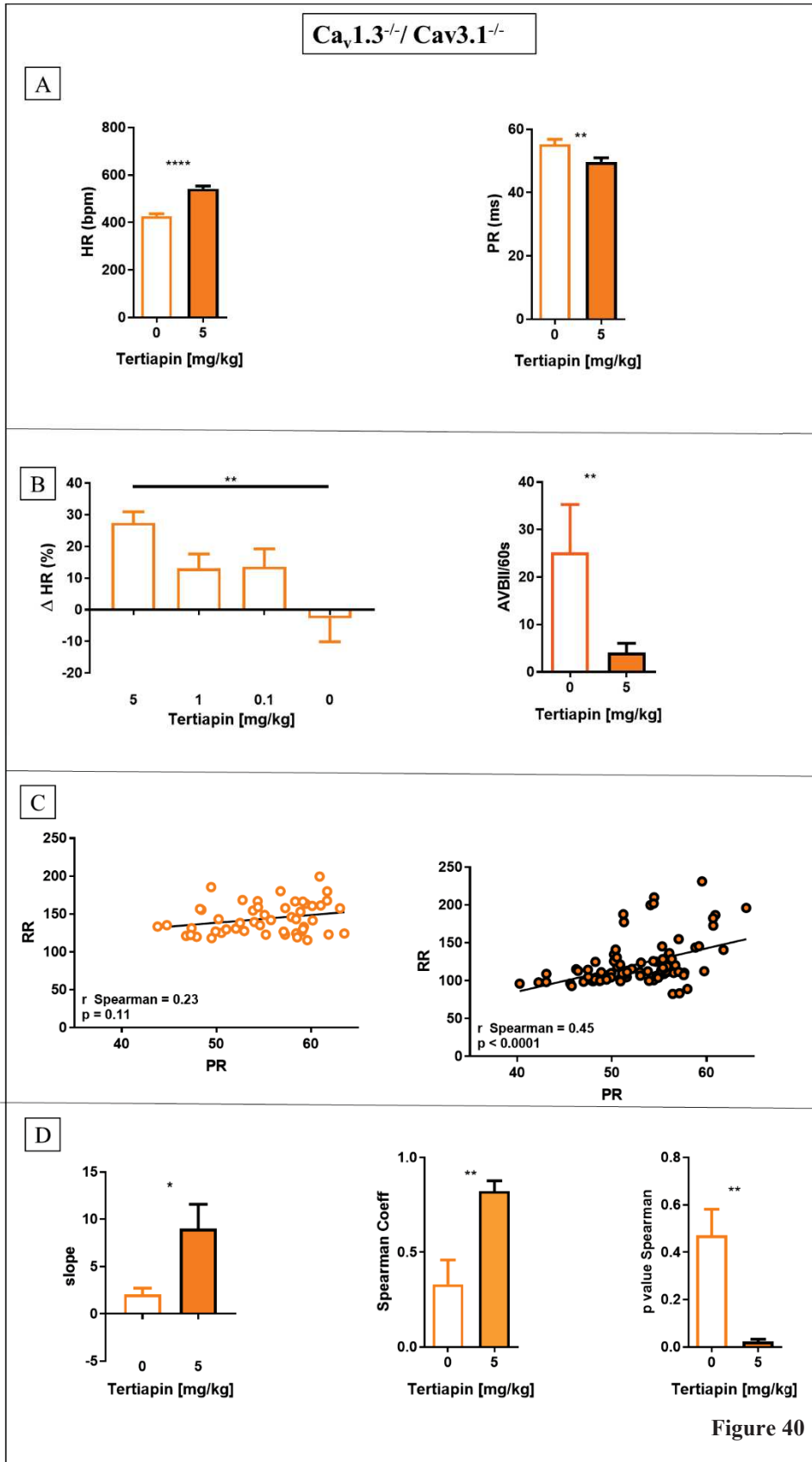


Figure 40 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$.

A : Histogrammes présentant les valeurs du HR et l'intervalle PR avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=11), statistique: paired t-test ; **B :** (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée (n=7 pour 0 mg/kg, n=9 pour 0,1 mg/kg, n=10 pour 1 mg/kg et n=11 pour 5 mg/kg). (Droite) Histogramme présentant le nombre de BAV/minute avant et après l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=11) statistique: Kruskal Wallis test et Wilcoxon test ; **C :** Graphique de la corrélation entre les intervalles PR et RR chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ avec la courbe de régression linéaire avant (Gauche) (n=51) et après (Droite)(n=58) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg), statistique: Spearman correlation ; **D :** (Gauche) Histogramme représentant la pente de la droite de régression RR/PR pour chaque souris avant et après l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=8) ; Histogramme montrant les moyennes des coefficients de corrélation de Spearman, (Centre) et les valeurs p relatives (Droite) calculées pour chaque souris avant et après injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=8), statistique: Mann-Whitney test et Spearman correlation.

Chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, l'injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q provoque une augmentation de la fréquence cardiaque (27 %) et une diminution de la durée de l'intervalle PR (10 %) (**Figure 40A**). La tertiapine-Q agit de manière dose-dépendante sur l'augmentation de la fréquence cardiaque. L'amplitude de cet effet est maximale suite à l'injection de 5 mg/kg alors qu'elle est de 13 % après l'injection de 1 et 0,1 mg/kg. La tertiapine-Q (5 mg/kg) réduit aussi très significativement le nombre de BAV / minute (84 %) (**Figure 40B**). Comme le démontrent la durée de l'intervalle PR et le nombre de BAV, la perte simultanée des sous-unités $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$ des canaux calciques de type L et T aggrave les défauts de conduction auriculo-ventriculaires décrits précédemment chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$. Chez ces souris double KO, il n'existe aucune corrélation entre les intervalles PR et RR : le coefficient de corrélation de rang Spearman est de 0,23 avec une p value de 0,11. L'injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q établit une corrélation linéaire positive (r-Spearman=0,45, p<0,0001) (**Figure 40C**). L'injection de la Tertiapine-Q augmente la pente de la droite de régression linéaire entre les intervalles PR et RR (**Figure 40D** gauche). Chez ce génotype, la tertiapine-Q est responsable de l'augmentation, statistiquement significative du coefficient de Spearman (**Figure 40D** centre et droite), ce qui suggère une augmentation de la corrélation entre ces deux intervalles. L'ensemble de ces observations démontrent que la tertiapine-Q rectifie la bradycardie et restaure la conduction auriculo-ventriculaire chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$.

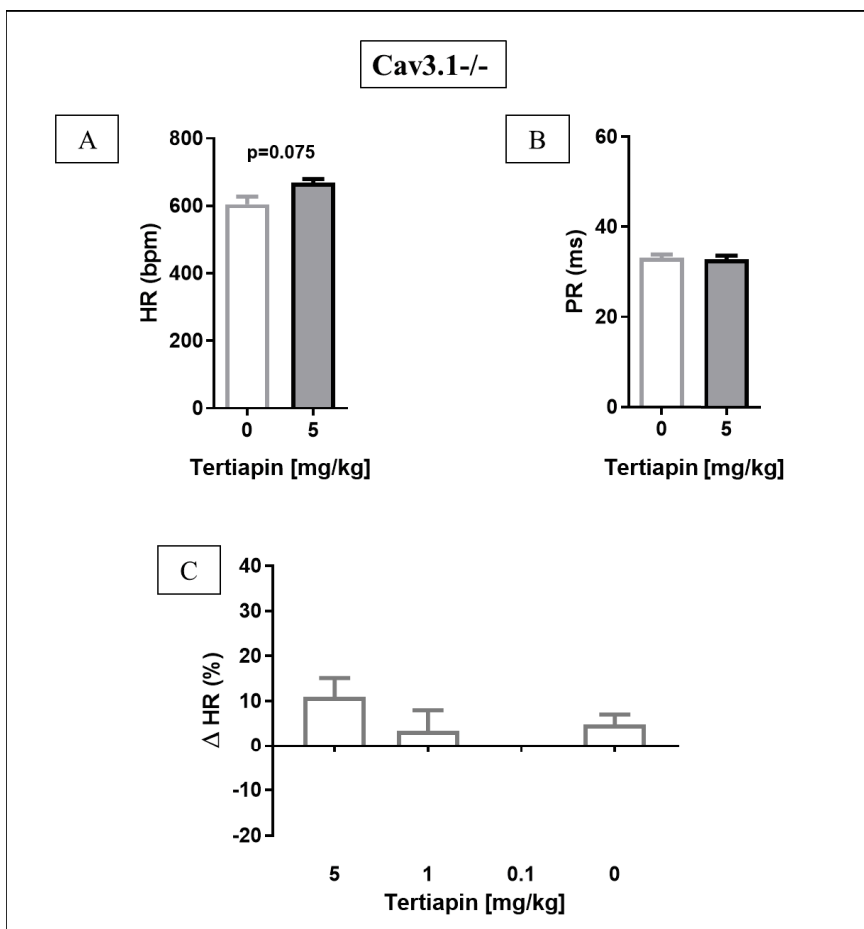


Figure 41 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$.

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) ($n=4$), statistique: *paired t-test* ; **C** : Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée ($n=9$ pour 0 mg/kg, $n=7$ pour 1 mg/kg et $n=4$ pour 5 mg/kg), statistique: *Kruskal Wallis test*.

Chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$, l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque (11 %), à la limite de la significativité statistique ($p = 0,075$) (**Figure 41A**), sans modifier la durée de l'intervalle PR (**Figure 41B**). Le faible nombre de souris $Ca_v3.1^{-/-}$ actuellement incluses dans cette expérience peut expliquer la non significativité de la hausse du HR. Des expériences complémentaires sont en cours. Comme pour les génotypes décrits précédemment, la tertiapine-Q agit de manière dose-dépendante sur l'augmentation de la fréquence cardiaque. L'amplitude de l'augmentation est maximale suite à l'injection de 5 mg/kg alors qu'elle est de 3 % après l'injection de 1 mg/kg (**Figure 41C**). La tertiapine-Q corrige la bradycardie modérée observée chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$.

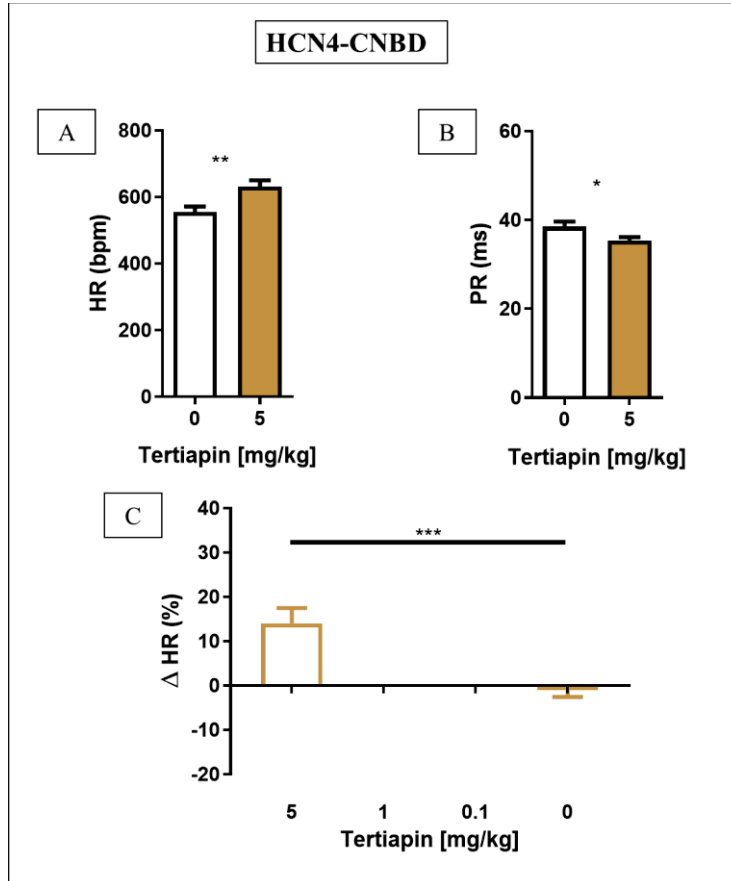


Figure 42 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris HCN4-CNBD.

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=8), statistique: paired t-test; **C** : Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée (n=8), statistique: Mann-Whitney test.

Chez les souris HCN4-CNBD, la perte du site de liaison à l'AMPC au niveau de l'extrémité COOH-terminale de la sous-unité HCN4, induit de la bradycardie et des troubles de conduction auriculo-ventriculaire. Chez ces souris, l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) entraîne une augmentation significative du HR (de l'ordre de 14%) (**Figure 42A et C**) et une diminution significative de la durée de l'intervalle PR (8%) (**Figure 42B**). L'étude complète de l'augmentation de la fréquence cardiaque, en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée, reste à réaliser (**Figure 42C**). Néanmoins, l'ensemble de ces observations met en évidence que la tertiapine-Q est capable de rectifier la bradycardie et d'améliorer la conduction auriculo-ventriculaire chez les souris HCN4-CNBD.

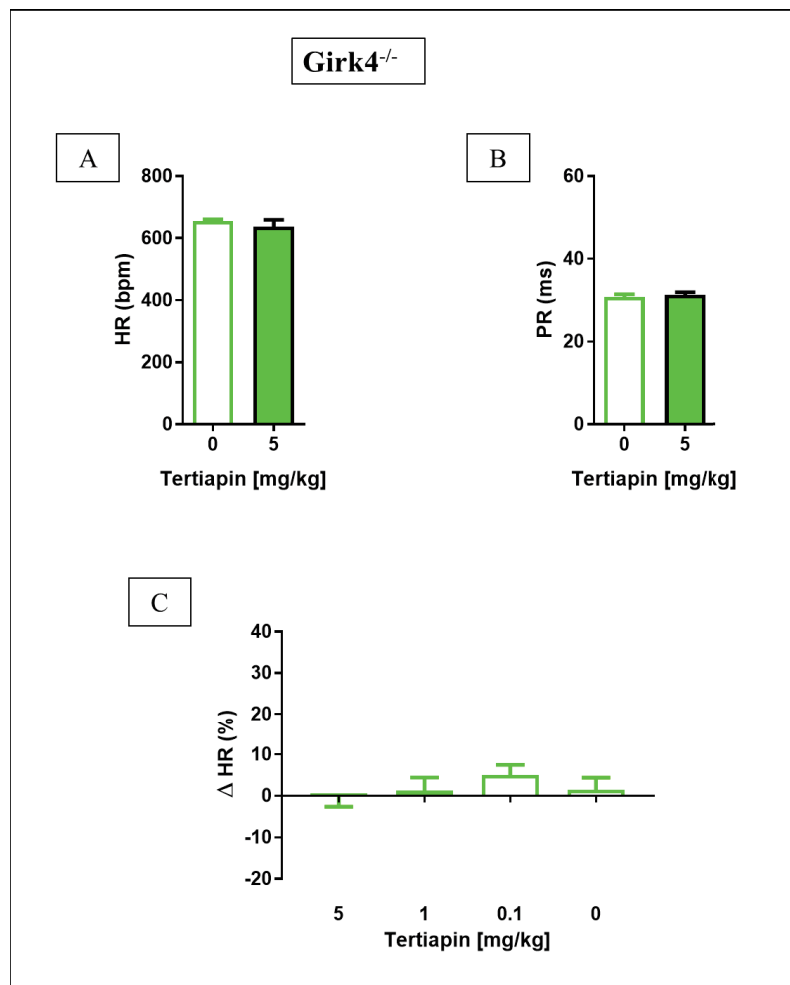


Figure 43 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris GirK4^{-/-}.

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) (n=11), statistique: paired t-test ; *C* : Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée (n=6 pour 0,1 mg/kg, n=6 pour 1 mg/kg et n=6 pour 5 mg/kg), statistique: Kruskal Wallis test.

Afin de valider que les canaux GirK4-Girk1 sont la cible de la tertiapine-Q, nous avons injecté ce peptide aux souris GirK4^{-/-}. Comme nous l'attendions, en l'absence du canal GirK4-Girk1, la tertiapine-Q n'a aucun effet sur la fréquence cardiaque (**Figure 43A**). Elle ne modifie pas la durée de l'intervalle PR (**Figure 43B**). Quelque soit la dose de tertiapine-Q injectée, le HR n'augmente pas (**Figure 43C**).

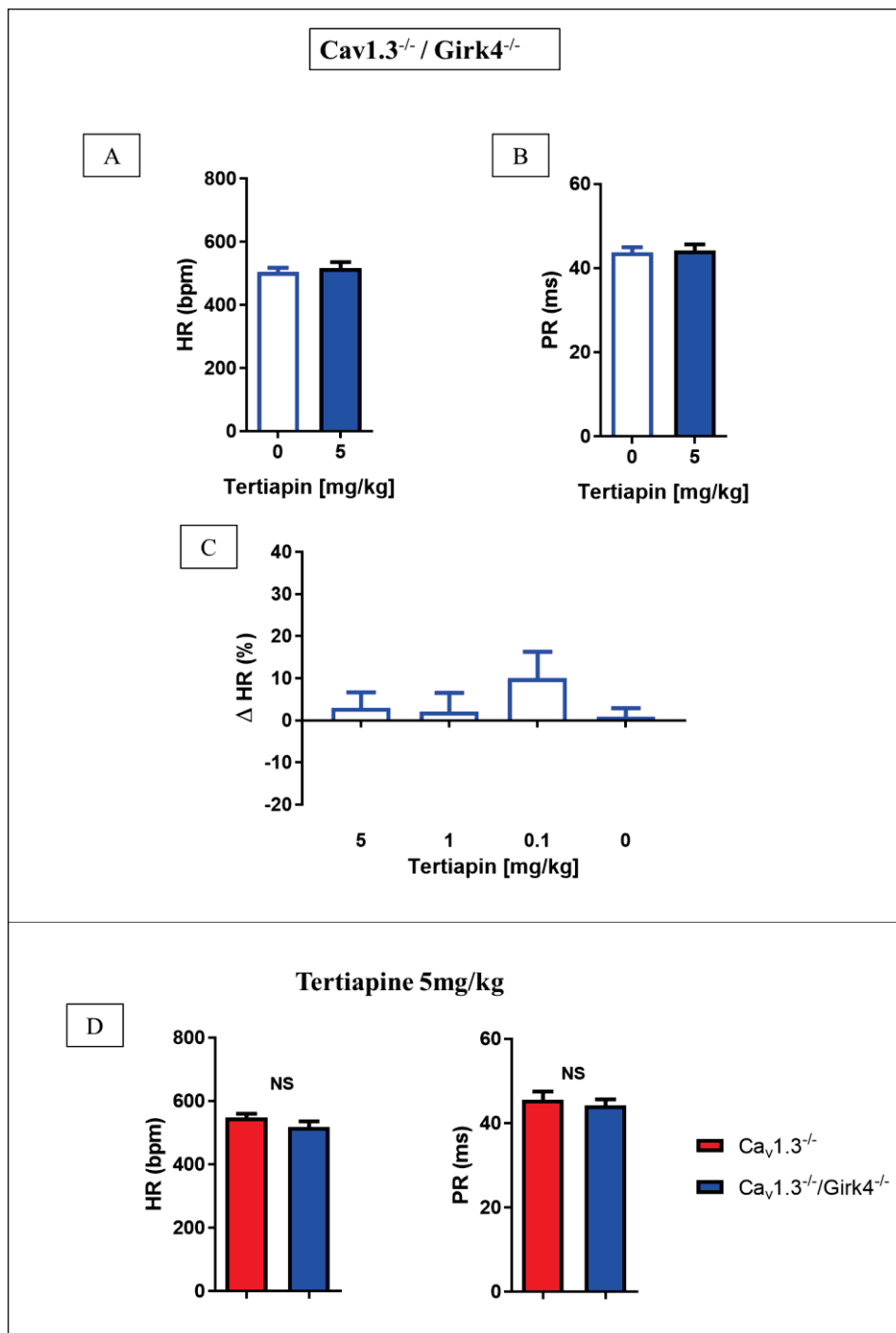


Figure 44 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$.

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) avant (barre blanche) et après (barre noire) l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) ($n=6$ pour 0mg/kg et $n=11$ pour la dose de 5 mg/kg). , statistique: paired t-test ; **C :** Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR en fonction des différentes doses de tertiapine-Q injectée ($n=6$ pour 0 mg/kg, $n=6$ pour 0,1 mg/kg , $n=6$ pour 1 mg/kg et $n=11$ pour 5 mg/kg) , statistique: Kruskal Wallis test ; **D :** Histogrammes présentant les valeurs du HR et de l'intervalle PR après injection de la tertiapine-Q à 5 mg/kg chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ ($n=15$) et $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ ($n=11$), statistique: Mann-Whitney t-test.

Chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$, dépourvues de la sous-unité $Ca_v1.3$ du canal calcique de type L et du canal $Girk4$, l'injection de tertiapine-Q n'a aucun effet sur la fréquence cardiaque (**Figure 44A**) et sur la durée de l'intervalle PR (**Figure 44B**). Aucun effet dose-réponse n'a été mis en évidence sur le HR (**Figure 44C**). Après injection de 5 mg/kg de tertiapine-Q, les HR des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ sont équivalents. Il en est de même pour la durée de l'intervalle PR (**Figure 44D**). Ces données mettent en évidence que l'ablation génétique du canal $Girk4$ chez la souris déjà dépourvue de la sous-unité $Ca_v1.3$ a le même effet, sur la fréquence cardiaque et sur la conduction auriculo-ventriculaire, que le blocage pharmacologique du courant I_{KACH} .

Alors que les souris $Scn5a^{+/-}$ ont un HR équivalent aux souris WT, la durée de leurs intervalles PR et du complexe QRS est significativement augmentée chez les souris $Scn5a^{+/-}$ par rapport aux souris WT (**Figure 45A**). Chez des souris $Scn5a^{+/-}$, l'injection de tertiapine-Q (5 mg/kg) rétablit une conduction auriculo-ventriculaire normale en raccourcissant la durée de l'intervalle PR, mais elle est sans effet sur la dépolarisation des ventricules (QRS) (**Figure 45D**). A plus faible dose, la tertiapine-Q ne modifie pas la durée du PR (**Figure 45B et C**). Nous pouvons corrélérer cette observation à l'hétérogénéité d'expression du canal $Girk4$ au sein des tissus nodaux cardiaques. En effet, le canal $Girk4$ est abondant dans le SAN et le NAV alors qu'il est faiblement présent dans les fibres de Purkinje. Son efficacité sur la dépolarisation ventriculaire y est donc restreinte.

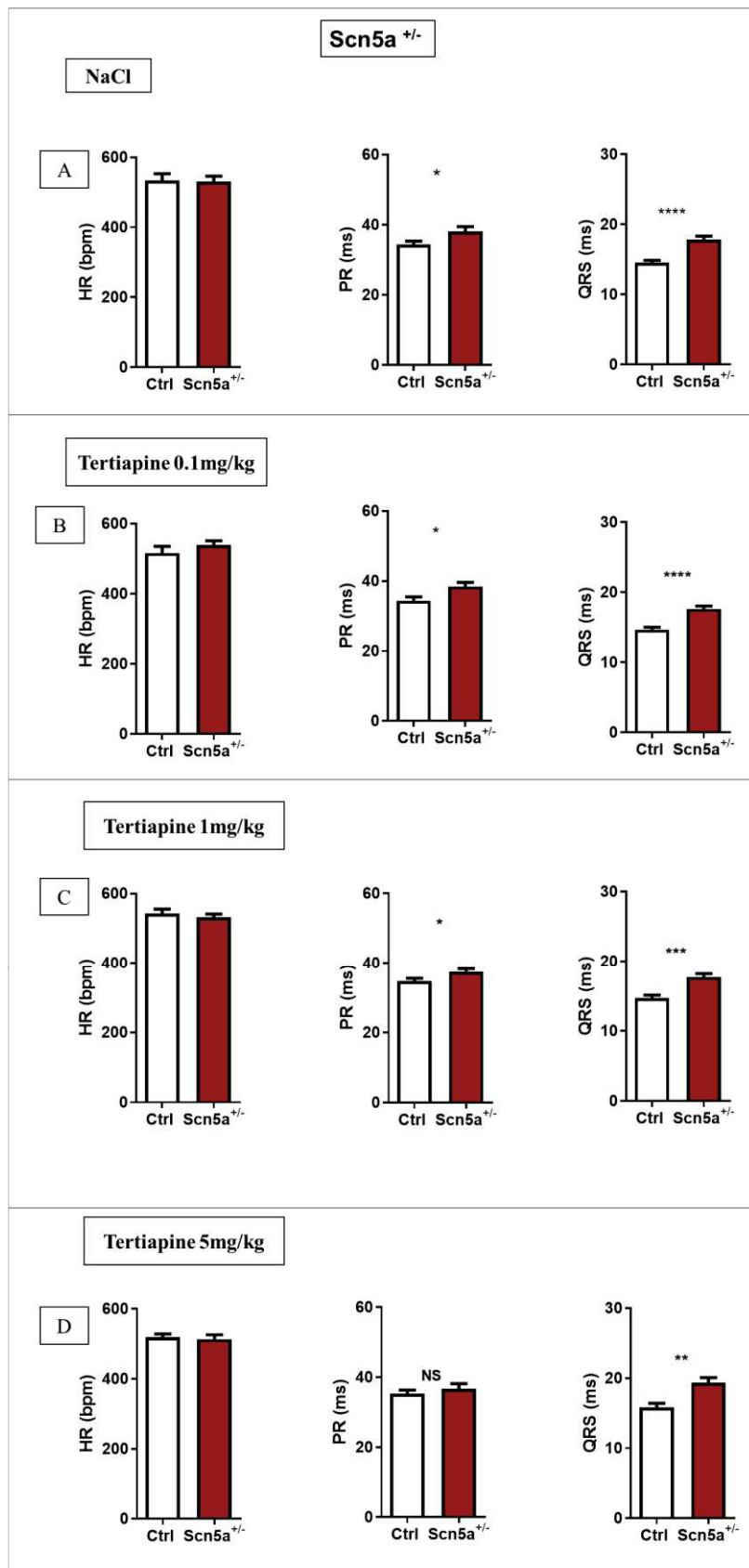


Figure 45 : Effet de l'injection de la tertiapine-Q chez les souris Scn5a^{+/-}.

Histogrammes représentant les valeurs du HR (Gauche), des intervalles PR (Centre) et QRS (Droite) chez les souris WT (barre blanche) et les souris Scn5a^{+/-} (barre noire) après l'injection

A : de NaCl (WT n=11 Scn5a^{+/-} n=16),

B : de tertiapine-Q à 0,1 mg/kg (WT n=12 Scn5a^{+/-} n=20),

C : de tertiapine-Q à 1 mg/kg (WT n=12 Scn5a^{+/-} n=18) et

D : de tertiapine-Q à 5 mg/kg (WT n=12 Scn5a^{+/-} n=19), statistique: unpaired t-test.

-2-

Comparaison injection
tertiapine-Q / atropine

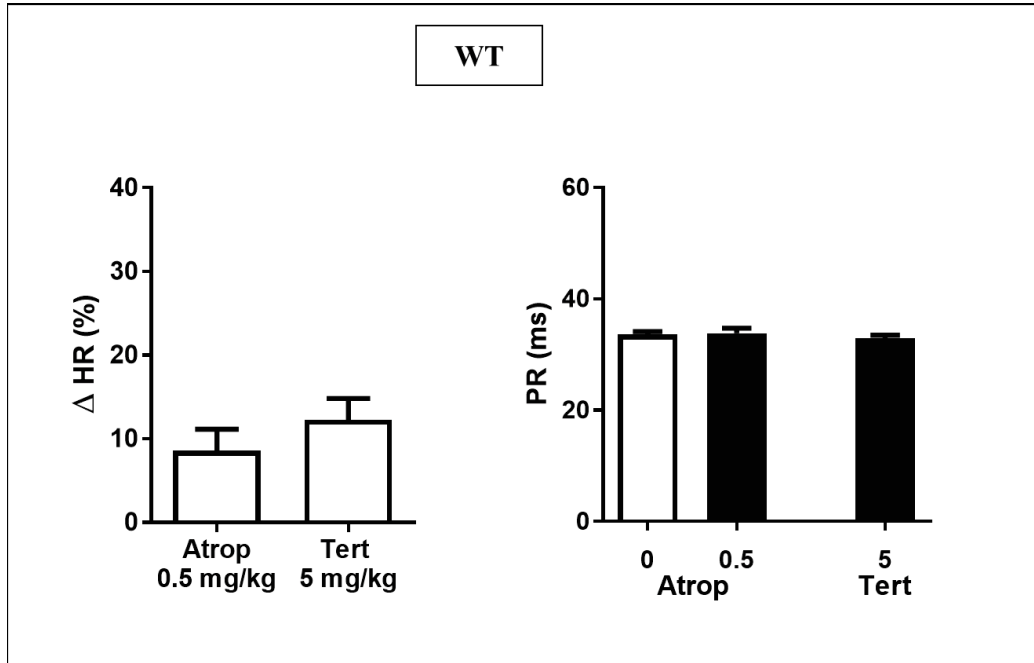


Figure 46 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (Atrop) (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (Tert) (5 mg/kg) chez les souris WT.

(Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=10) ou de tertiapine-Q (n= 19), statistique: Mann-Whitney test ; (Droite) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche) (n=29) et après (barre noire) (n=10) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n=19), statistique: one-way ANOVA.

Chez les souris WT, les effets de l'atropine (0.5 mg/kg) et de la tertiapine-Q (5 mg/kg) sont comparables. En effet, ces molécules induisent une augmentation d'environ 10 % de la fréquence cardiaque. De plus, ces molécules n'induisent aucune variation de la durée de l'intervalle PR (**Figure 46**).

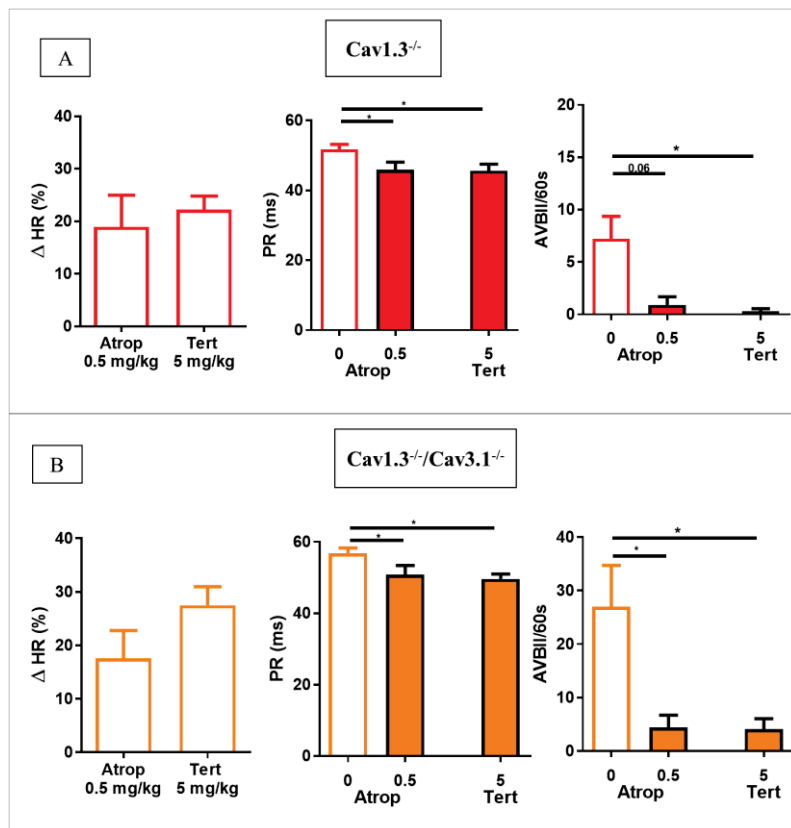


Figure 47 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (5 mg/kg) chez les souris Cav1.3^{-/-} (A) et les souris Cav1.3^{-/-}/Cav3.1^{-/-} (B)

A (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=10) ou de tertiapine-Q (n=15), statistique: Mann-Whitney test ; (Centre) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche) (n=25) et après (barre noire) (n=10) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n=15), statistique: one-way ANOVA ; (Droite) Histogramme représentant le nombre de BAV/minute avant (barre blanche) (n=26) et après (barre noire) (n=11) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n=15), statistique: one-way ANOVA ; B (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=10) ou de tertiapine-Q (n=11), statistique: Mann-Whitney test ; (Centre) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche) (n=21) et après (barre noire) (n=10) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n=11), statistique: one-way ANOVA ; (Droite) Histogramme représentant le nombre de BAV/minute avant (barre blanche) (n=21) et après (barre noire) (n=10) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n=11), statistique: one-way ANOVA .

Chez les souris Ca_v3.1^{-/-} comme chez les souris Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}, l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (5 mg/kg) induit une augmentation de la fréquence cardiaque de l'ordre de 20 à 25 %, une réduction significative de la durée de l'intervalle PR de l'ordre de 10 % et une réduction drastique du nombre de BAV/minute (**Figure 47A et B**). Ces deux molécules permettent donc de corriger les dysfonctions sinusales et les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire. Au vue de ces résultats, nous pouvons dire qu'à ce stade, la tertiapine-Q et l'atropine permettent de corriger les dysfonctions sinusales et les troubles de conduction sur ces deux génotypes.

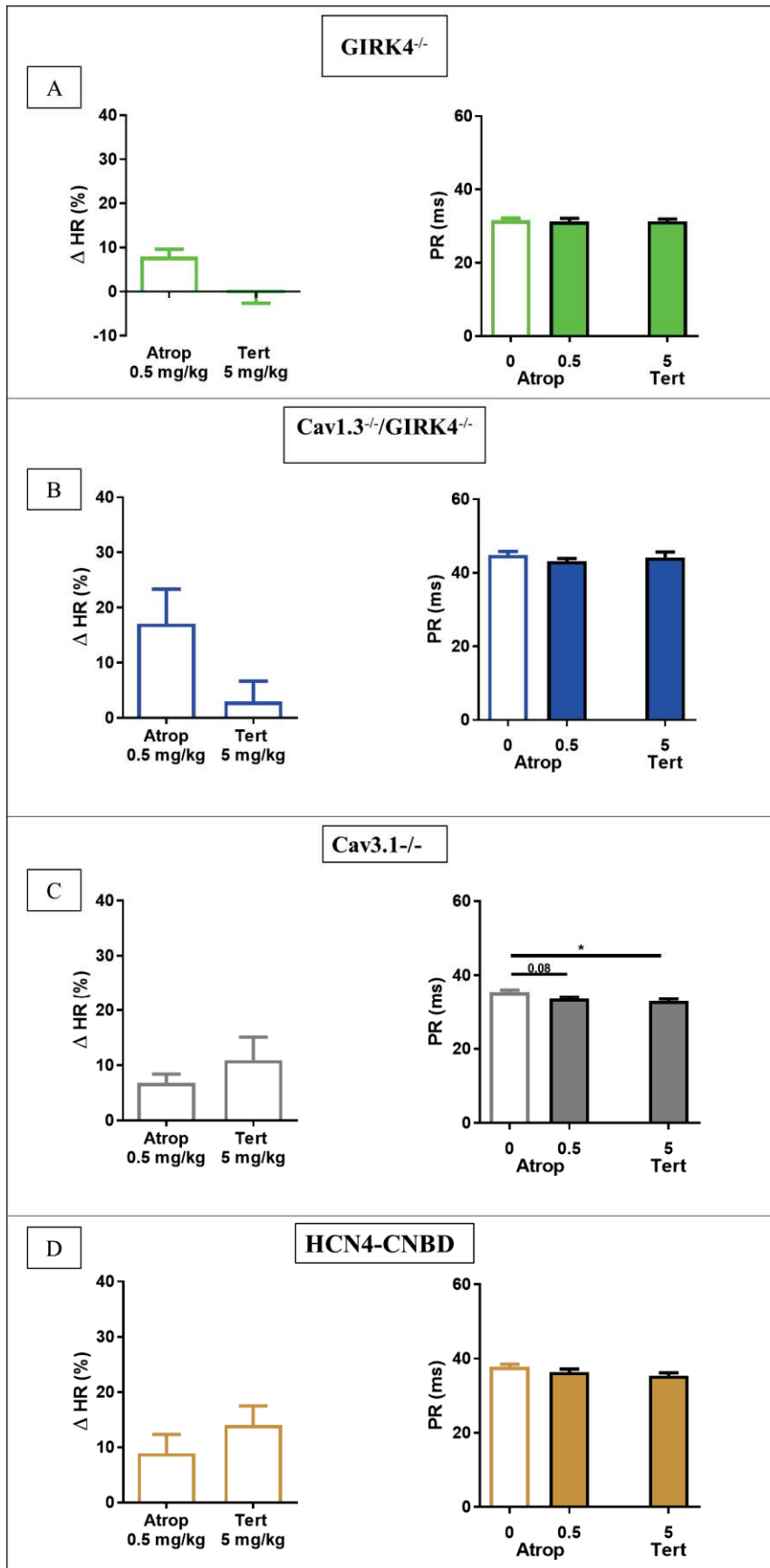


Figure 48 : Comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (5 mg/kg) chez les souris *Girk4*^{-/-} (A), les souris *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} (B), les souris *Ca_v3.1*^{-/-} (C) et les souris *HCN4*-CNBD (D). A (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=6) ou de tertiapine-Q (n= 11) statistique: Mann-Whitney test ; (Droite) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche) (n=17) et après (barre noire) (n=6) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 11), statistique: one-way ANOVA ; B (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=6) ou de tertiapine-Q (n= 11) statistique: Mann-Whitney test ; (Droite) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche)(n=17) et après (barre noire) (n=6) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 11), statistique: one-way ANOVA ; C (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=5) ou de tertiapine-Q (n= 4) statistique: Mann-Whitney test ; (Droite) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche)(n=9) et après (barre noire) (n=5) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 4) statistique: one-way ANOVA ; D (Gauche) Histogramme montrant le pourcentage d'augmentation du HR consécutivement à l'injection d'atropine (n=8) ou de tertiapine-Q (n= 8) statistique: Mann-Whitney test ; (Droite) Histogramme présentant les valeurs de l'intervalle PR avant (barre blanche) (n=16) et après (barre noire) (n=8) l'injection d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 8), statistique: one-way ANOVA.

Comme nous l'avons vu précédemment, les souris *Girk4*^{-/-}, *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} et *Ca_v3.1*^{-/-} ne présentent pas de dysfonction sinusale. Les injections d'atropine (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (5 mg/kg) n'ont aucune influence sur la durée de leur intervalle PR. En l'absence du canal *Girk4*, les souris *Girk4*^{-/-}, *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} sont insensibles à l'injection de tertiapine-Q alors qu'elles répondent à l'injection d'atropine par une augmentation du HR, respectivement de 8 % et de 17 %. Les souris *Ca_v3.1*^{-/-}, comme les souris *HCN4*-CNBD, répondent à l'atropine et à la tertiapine-Q par une hausse voisine de 10 % de leur fréquence cardiaque (**Figure 48 A, B, C et D**).

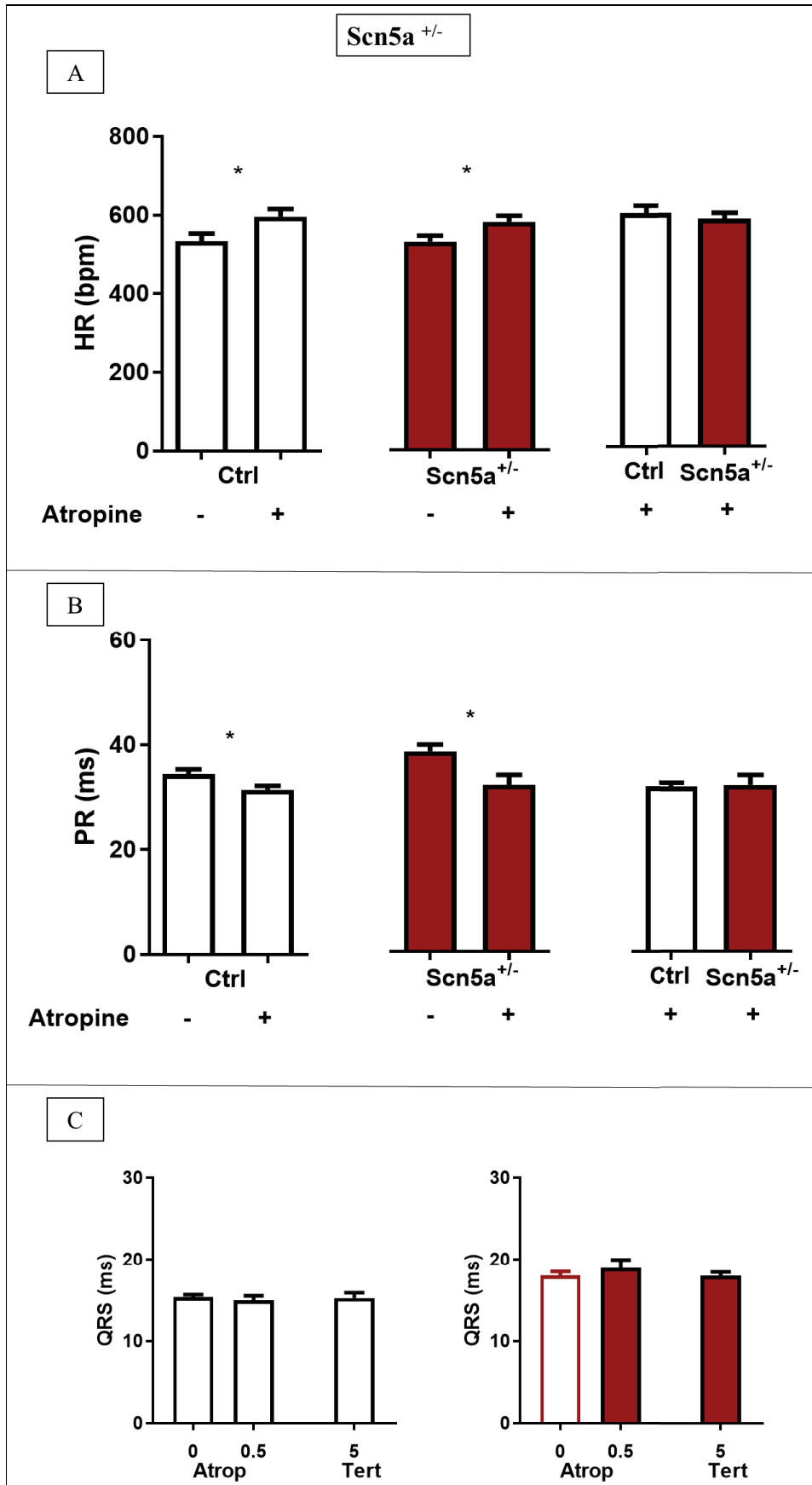


Figure 49

Figure 49 : Souris $Scn5a^{+/-}$: effet de l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) et comparaison de l'effet de l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) et de tertiapine-Q (5 mg/kg)

A et B : Histogrammes représentant les valeurs du HR (A) et l'intervalle PR (B) chez les souris WT (barre blanche) et les souris $Scn5a^{+/-}$ (barre noire) avant et après l'injection d'atropine (Souris WT : n=11 /n=8 avant /après atropine - Souris $Scn5a^{+/-}$: n=16 / n=8 -(sans) /+(avec) atropine), statistique: unpaired t-test ; **C :** Gauche : Histogrammes montrant les valeurs du complexe QRS chez les souris WT avant (n=18), et après (n=7) l'injection, d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 10), statistique : unpaired t-test ; Droite : Histogrammes montrant les valeurs du complexe QRS chez les souris $Scn5a^{+/-}$ avant (n=16), et après (n=8) l'injection, d'atropine ou de tertiapine-Q (n= 8), statistique : one- way ANOVA.

Chez les souris WT comme chez les souris $Scn5a^{+/-}$, l'injection d'atropine (0,5 mg/kg) augmente, respectivement, la fréquence cardiaque de 8% et de 10%. Suite à l'injection d'atropine, les HR des souris WT et $Scn5a^{+/-}$ sont comparables (**Figure 49A**). De plus, l'atropine diminue la durée de l'intervalle PR de l'ordre de 10 % chez les souris WT et de 16 % chez les souris mutées. Après l'injection d'atropine, les PR des souris WT et $Scn5a^{+/-}$ sont équivalents (**Figure 49B**). Nous ne relevons aucune différence statistiquement significative pour l'intervalle QRS (**Figure 49C**). L'atropine accélère donc la conduction auriculo-ventriculaire des souris WT et $Scn5a^{+/-}$.

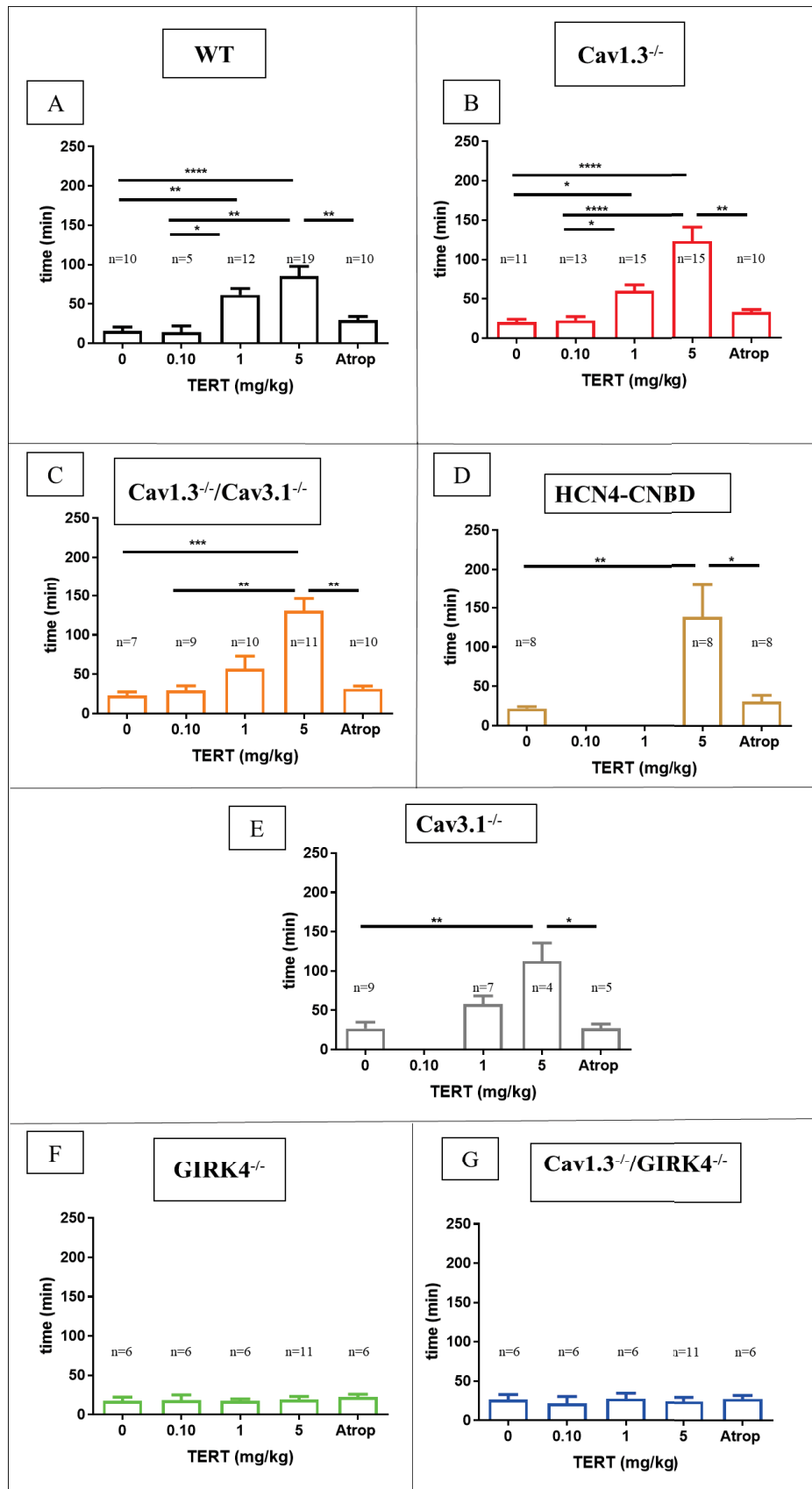


Figure 50

Figure 50 : Durée d'action de la tertiapine-Q (0,1 ; 1 et 5 mg/kg) et de l'atropine (0,5 mg/kg) chez les souris WT (A), $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (C), $HCN4-CNBD$ (D), $Ca_v3.1^{-/-}$ (E), $Girk4^{-/-}$ (F) et $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (G) (les n sont notés sur les figures), statistique : one-way ANOVA.

Pour terminer cette étude, nous nous sommes intéressés à la durée de l'effet de la tertiapine-Q (0,1 ; 1 et 5 mg/kg) et de l'atropine (0,5 mg/kg) chez les différents génotypes de souris (**Figure 50A à G**). Chez les souris atteintes de dysfonctions sinusales et troubles de conduction, nous constatons que la durée d'action de la tertiapine-Q est dépendante de la dose injectée. Effectivement, l'effet de la tertiapine-Q à 1 mg/kg dure entre 50 et 60 minutes, alors qu'injectée à 5 mg/kg, son effet se prolonge pendant 1h30 à 2 heures. A 0,1 mg/kg, l'effet de la tertiapine-Q ne dure pas plus longtemps que celui de l'injection de NaCl (environ 15 minutes) (**Figures 50A à E**). Nous observons également ce phénomène chez les souris $Girk4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (**Figures 50F et G**). Quelque soient les génotypes des souris, l'atropine n'agit pas plus longtemps que 30 minutes.

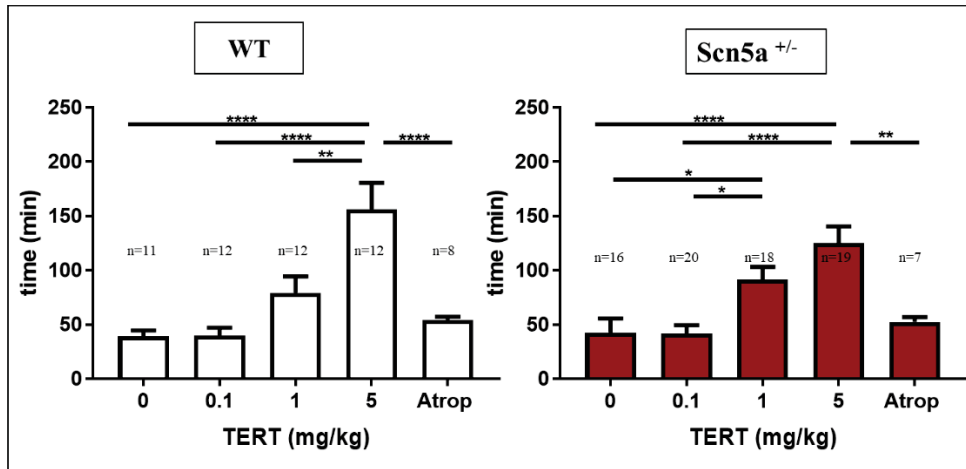


Figure 51 : Durée d'action de la tertiapine-Q (0,1 ; 1 et 5 mg/kg) et de l'atropine (0,5 mg/kg) chez les souris *Scn5a*^{+/-} (les n sont notés sur les figures), statistique : one-way ANOVA.

Chez les souris WT et *Scn5a*^{+/-}, nous observons également que la durée de l'effet de la tertiapine-Q dépend de la dose injectée aux souris. Ainsi, à 1 mg/kg la tertiapine-Q agit entre 80 et 90 minutes ; à 5 mg/kg, son action perdure entre 2h et 2h30. L'atropine, quant à elle, a un effet pendant environ 50 minutes (**Figure 51**).

DISCUSSION

L'activité pacemaker du SAN contrôle la fréquence cardiaque. Une dysfonction de l'automatisme du SAN est à l'origine du SSS. Les caractéristiques typiques du SSS incluent une bradycardie et une incapacité du système nerveux sympathique à accélérer la fréquence du SAN (incompétence chronotrope) (Ewy, 2014). Le SSS peut-être provoqué par des causes génétiques et acquises résumées récemment dans la revue de Monfredi et Boyett (Monfredi and Boyett, 2015) (**Figure 52**)

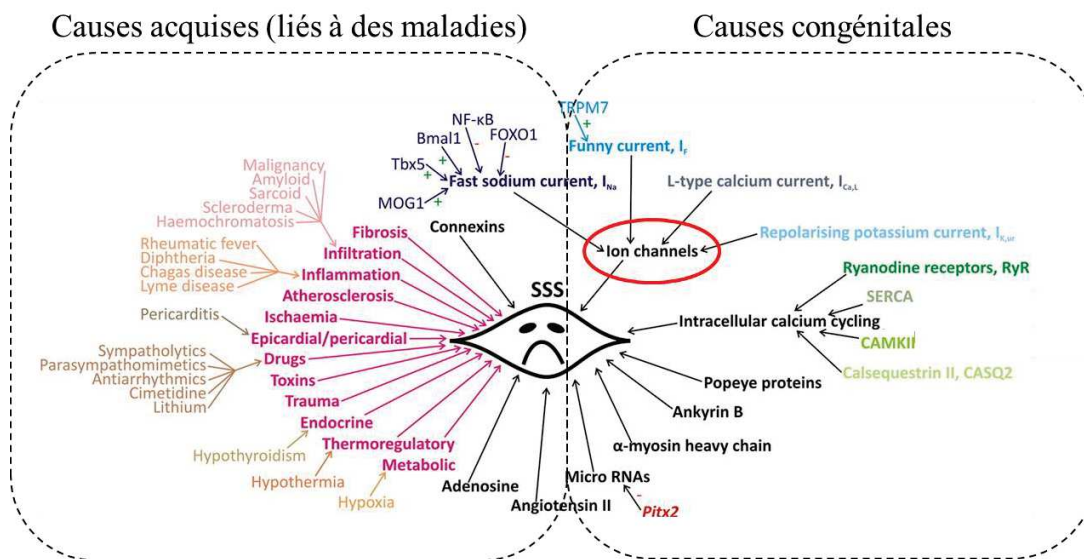


Figure 52 : Origines multifactorielles provoquant le SSS. De (Monfredi and Boyett, 2015)

De nos jours, il n'existe pas de thérapie pharmacologique disponible pour améliorer la fréquence cardiaque et la conduction auriculo-ventriculaire dans le contexte du SSS symptomatique chronique. En effet, la prise en charge pharmacologique de la bradycardie par l'atropine, l'isoproterenol ou la théophylline est limitée aux cas aigus et réversibles. Cependant, la vaste majorité des patients présente des symptômes chroniques et irréversibles qui peuvent être pris en charge uniquement par l'implantation d'un pacemaker électronique (Brignole et al., 2013). En présence de BAV, l'implantation d'un pacemaker électronique permanent est indiquée même lorsque la bradycardie est non symptomatique (Brignole et al., 2013).

Jensen *et al.* (Jensen et al., 2014) ont mené une étude prospective qui met en évidence que le nombre de patients affectés par le SSS serait en augmentation constante dans les cinquante prochaines années. Ceci est étroitement corrélé au vieillissement de la population. Par conséquent, nous pouvons estimer qu'il y aura plus de 170 000 nouveaux cas de SSS par an. Ceci fera significativement augmenter le nombre d'implantation de stimulateur cardiaque permanent. Malgré son efficacité incontestable, il faut considérer que l'implantation de pacemaker électronique présente des contraintes, des limitations et des complications (Kiviniemi et al., 1999). Le développement de thérapies complémentaires et alternatives aux stimulateurs cardiaques est donc fondamental pour la prise en charge du SSS, l'amélioration de la qualité de vie des patients et la limitation du nombre d'implantation de pacemakers électroniques.

En s'appuyant sur les données obtenues précédemment par notre équipe, nous avons étudié les effets de l'inhibition pharmacologique du courant $I_{K_{ACH}}$. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées pour des canaux ioniques impliqués dans l'automatisme et la conduction cardiaque. Ces souris présentent un ralentissement de la fréquence cardiaque associé à des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire. Notre objectif a été de vérifier si l'inhibition du courant $I_{K_{ACH}}$ était capable d'améliorer la fonction sinusale et la conduction auriculo-ventriculaire chez un large spectre des modèles de SSS congénitale.

Les différents modèles murins utilisés miment les pathologies cardiaques humaines

Nos résultats (**Figures 35 et 36**) confirment que les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, HCN4-CNBD, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Scn5a^{+/-}$ sont de bons modèles de pathologies cardiaques humaines. En effet, les tracés électrocardiographiques de ces souris présentent les mêmes caractéristiques que ceux des patients atteints de SSS asymptomatique ou chronique. En particulier, la bradycardie modérée typique des souris HCN4-CNBD et $Ca_v3.1^{-/-}$ est caractéristique du SSS asymptomatique. Elle constitue un signe avant-coureur d'une SSS symptomatique. De plus, les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, qui présentent une

dysfonction sinusale prononcée et des BAV sévères, possèdent des électrocardiogrammes comparables à ceux enregistrés dans les stades sévères et chroniques de SSS. Les souris *Scn5a*^{+/-} montrent des signes typiques retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Lenègre, affectant essentiellement le système de conduction.

La tertiapine-Q corrige les dysfonctions sinusales et les troubles de la conduction

Pour débiter notre étude, nous avons choisi de tester l'effet de la tertiapine-Q sur des modèles de souris génétiquement modifiées pour le canal GIRK4. Comme attendu, en l'absence de sa cible primaire, la tertiapine-Q n'a d'effet ni sur la fréquence (HR), ni sur la conduction auriculo-ventriculaire (intervalle PR) chez les souris *Girk4*^{-/-} (**Figure 43**) et *Ca_v1.3*^{-/-}/*Girk4*^{-/-} (**Figure 44**).

Chez les souris *Ca_v1.3*^{-/-} et *Ca_v1.3*^{-/-}/*Ca_v3.1*^{-/-}, l'inhibition pharmacologique du courant *I_{K_{ACh}}* corrige la bradycardie et les BAV (**Figures 39 et 40**). La tertiapine-Q permet de rétablir la corrélation entre le RR et le PR présente chez les WT.

Chez les souris *Ca_v3.1*^{-/-} (**Figure 41**), la tertiapine-Q améliore la conduction malgré la non significativité statistique probablement liée au nombre trop faible de souris.

La tertiapine-Q restaure la fonction sinusale et rétablit une meilleure conduction auriculo-ventriculaire chez les souris HCN4-CNBD (**Figure 42**).

Malgré l'absence de dysfonction sinusale, les souris *Scn5a*^{+/-} présentent des troubles de conduction et de dépolarisation ventriculaire. Chez ces souris, la tertiapine-Q (5 mg/kg) améliore la conduction auriculo-ventriculaire sans affecter la dépolarisation ventriculaire (**Figure 45**). Alors que les canaux *Girk4* sont abondants dans le SAN et le NAV, ils sont probablement peu présents dans les fibres de Purkinje et le myocarde ventriculaire. Cette distribution inégale des canaux *Girk4* dans le tissu cardiaque pourrait expliquer l'absence d'effet de la tertiapine-Q sur la durée de l'intervalle QRS des souris *Scn5a*^{+/-}.

Dans cette étude, nous démontrons que l'inhibition pharmacologique du courant I_{KACH} améliore sensiblement les dysfonctions sinusales, prévient des syndromes tachycardie-bradycardie et normalise la conduction auriculo-ventriculaire dans les modèles de souris mimant le SSS humain.

La tertiapine-Q est active plus longtemps que l'atropine sur les dysfonctions sinusales et des troubles de la conduction.

En clinique, l'atropine est utilisée pour traiter les bradycardies aiguës post-opératoires, qui sont généralement réversibles. Nous avons souhaité comparer les effets de l'atropine à celui de la tertiapine-Q sur nos souris modèles. Nos résultats démontrent que l'atropine a les mêmes effets que la tertiapine-Q sur la correction des dysfonctions sinusales et les troubles de la conduction (**Figures 47 et 49**). Quelques soient les souris étudiées, l'effet de la tertiapine-Q (5 mg/kg) est plus long que celui de l'atropine. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliciter ces différences de durée d'action. Premièrement, il est possible que l'atropine soit dégradée et éliminée par l'organisme plus rapidement que la tertiapine-Q. En second lieu, nous pouvons envisager que la réduction de la durée d'action de l'atropine par rapport à la tertiapine-Q soit liée à l'effet différentiel de ces deux molécules sur la voie AMPc dépendante. Alors que la tertiapine-Q inhibe directement et sélectivement le courant I_{KACH} sans affecter le niveau d'AMPc intracellulaire, l'atropine (antagoniste des récepteurs cholinergiques) se fixe sur les récepteurs muscariniques du nœud sinusal et empêche la fixation des protéines G sur les canaux Girk4-Girk1. Ceci bloque l'inhibition de l'adénylate cyclase par la voie muscarinique cGMP-dépendante et provoque une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire qui permet d'activer les canaux I_f et d'augmenter l'activité de la PKA. Il en résulte une augmentation de l'activité des canaux calciques et une augmentation de la libération de Ca^{2+} par les récepteurs à la ryanodine (RyR2). L'ensemble de ces phénomènes se traduit par une augmentation de la fréquence cardiaque. Cette augmentation de la fréquence cardiaque déclenche l'activation du baroréflexe qui stimule l'activité parasympathique qui s'oppose alors à l'augmentation de la fréquence cardiaque. L'effet de l'atropine est ainsi abrégé.

***CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES***

Le fondement de cette étude est basé sur le concept du « ciblage compensatoire du canal I_{KCh} » développé récemment par notre équipe (Mesirca et al., 2016a). Ce concept ouvre des perspectives nouvelles pour le développement de stratégies thérapeutiques innovantes pour lutter contre le SSS. Cette stratégie consiste à inhiber le courant sortant I_{KCh} qui s'oppose à l'effet dépolarisant des courants entrants I_f , I_{Ca} de la DD. Ceci rétablit l'équilibre de l'automatisme normal.

La revue de Monfredi et Boyett (Monfredi and Boyett, 2015) met en évidence certains facteurs génétiques contribuant au SSS. Parmi eux, notons des mutations de type « perte de fonction » qui affectent des canaux ioniques et des protéines d'échafaudage régulant l'adressage membranaire de ces canaux. Toutefois, la majorité des patients atteints de SSS présente cette pathologie en tant que comorbidité d'une maladie principale (Monfredi and Boyett, 2015). Une de nos perspectives majeures sera de tester l'inhibition d' I_{KCh} sur des modèles de SSS secondaires, telles que celle associées à l'insuffisance cardiaque ou autres pathologies cardiovasculaire. Dans ce cadre, il est opportun de considérer que la bradycardie a été indiquée comme responsable d'une fraction importante (40 %) des évènements de mort subite associés à l'insuffisance cardiaque (Gang et al., 2010). Des évidences expérimentales récentes montrent que dans un modèle animal de SSS associée à l'insuffisance cardiaque, la bradycardie est due à une réduction de l'expression de HCN4 (M. Boyett, communication personnelle). Par analogie avec nos modèles de SSS congénitale basés sur la perte de fonction de HCN4, ces résultats suggèrent que le ciblage d' I_{KCh} pourrait être une stratégie préventive efficace. En perspective, il serait aussi intéressant d'apporter une solution thérapeutique complémentaire aux patients qui ont subi une intoxication médicamenteuse du SAN entraînant une bradycardie aigue. D'autres cas de bradycardie secondaires dans lesquelles le ciblage d' I_{KCh} pourrait être intéressant sont, par exemple, les SSS liées au diabète ou à l'hypothyroïdie. Pour finir, il faut mentionner que les athlètes de haut niveau présentent parfois des SSS chroniques symptomatiques après l'arrêt de leur carrière sportive. Récemment il a été mis en évidence que ce type de bradycardie est lui aussi lié à une baisse d'expression des canaux HCN4 (D'Souza et al., 2014). L'inhibition pharmacologique d' I_{KCh} pourrait se révéler efficace aussi dans ce profil de patient.

Le problème actuel de l'emploi de l'atropine et de la théophylline pour la prise en charge du SSS symptomatique chronique réside sur leurs nombreux effets extracardiaques. Ces effets restreignent l'usage de ces médicaments aux cas aigus, lorsqu'un traitement de courte durée est requis. Toutefois, la grande majorité des patients présentant des symptômes chroniques et irréversibles peuvent être pris en charge uniquement par un pacemaker électronique. Le développement de peptides bloqueurs du courant I_{KACH} , possédant des effets cardio-spécifiques, permettrait une future indication de l'inhibition à long terme I_{KACH} en clinique. Il est intéressant de noter que beaucoup de patients ne nécessite pas l'implantation immédiate d'un pacemaker, mais uniquement d'un traitement qui améliore la fréquence cardiaque au repos ou à l'effort. Dans ce cadre, l'inhibition du courant I_{KACH} par des peptides dérivés de la tertiapine-Q pourrait présenter un avantage clair.

Dans cette perspective, il faudra améliorer la spécificité de la tertiapine-Q afin qu'elle cible spécifiquement les canaux Girk4. En effet, il a été démontré que la tertiapine-Q agit également d'autres canaux potassiques, notamment ROMK1 (Jin and Lu, 1998) et BK (Kanjhan et al., 2005). Afin de parfaire la sélectivité et la biodisponibilité de la tertiapine-Q, il faut prévoir de modifier de la séquence primaire du peptide. L'étude de la toxicité et de la bio-distribution de la tertiapine-Q iodée et de ces peptides dérivés sera importante.

Ce sujet de recherche peut présenter un grand intérêt pour les laboratoires et les cliniciens. Cette stratégie thérapeutique peut pallier à l'implantation de pacemaker électronique et les complications qui peuvent survenir.

BIBLIOGRAPHIE

- Adan, V., and Crown, L.A. (2003). Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician* 67, 1725-1732.
- Alboni, P., Baggioni, G.F., Scarfo, S., Cappato, R., Percoco, G.F., Paparella, N., and Antonioli, G.E. (1991). Role of sinus node artery disease in sick sinus syndrome in inferior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 67, 1180-1184.
- Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M.E., and Isbrandt, D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12189-12194.
- Alings, A.M., Abbas, R.F., and Bouman, L.N. (1995). Age-related changes in structure and relative collagen content of the human and feline sinoatrial node. A comparative study. *Eur Heart J* 16, 1655-1667.
- Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Viscomi, C., Moroni, A., and DiFrancesco, D. (2001). Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 117, 519-532.
- An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.P., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S., *et al.* (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553-556.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.C., Thomsen, P.E., Thuesen, L., Vesterlund, T., Pedersen, A.K., and Mortensen, P.T. (1998). Atrioventricular conduction during long-term follow-up of patients with sick sinus syndrome. *Circulation* 98, 1315-1321.
- Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nurnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., *et al.* (2011). Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14, 77-84.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., and DiFrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 107, 59-79.
- Baumann, L., Gerstner, A., Zong, X., Biel, M., and Wahl-Schott, C. (2004). Functional characterization of the L-type Ca²⁺ channel Cav1.4 α 1 from mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 708-713.
- Benson, D.W., Wang, D.W., Dymont, M., Knilans, T.K., Fish, F.A., Strieper, M.J., Rhodes, T.H., and George, A.L., Jr. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 112, 1019-1028.
- Bladen, C., Gunduz, M.G., Simsek, R., Safak, C., and Zamponi, G.W. (2014a). Synthesis and evaluation of 1,4-dihydropyridine derivatives with calcium channel blocking activity. *Pflugers Arch* 466, 1355-1363.
- Bladen, C., Hamid, J., Souza, I.A., and Zamponi, G.W. (2014b). Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Mol Brain* 7, 36.
- Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 47, 658-687.

- Brignole, M., Auricchio, A., Baron-Esquivias, G., Bordachar, P., Boriani, G., Breithardt, O.A., Cleland, J., Deharo, J.C., Delgado, V., Elliott, P.M., *et al.* (2013). 2013 ESC guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: the task force on cardiac pacing and resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace* 15, 1070-1118.
- Brown, H.F., DiFrancesco, D., and Noble, S.J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280, 235-236.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* 55, 575-578.
- Chambers, J.C., Zhao, J., Terracciano, C.M., Bezzina, C.R., Zhang, W., Kaba, R., Navaratnarajah, M., Lotlikar, A., Sehmi, J.S., Kooner, M.K., *et al.* (2010). Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet* 42, 149-152.
- Chandler, N.J., Greener, I.D., Tellez, J.O., Inada, S., Musa, H., Molenaar, P., DiFrancesco, D., Baruscotti, M., Longhi, R., Anderson, R.H., *et al.* (2009). Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119, 1562-1575.
- Chandran, D.S., Ali, N., Jaryal, A.K., Jyotsna, V.P., and Deepak, K.K. (2013). Decreased autonomic modulation of heart rate and altered cardiac sympathovagal balance in patients with Cushing's syndrome: role of endogenous hypercortisolism. *Neuroendocrinology* 97, 309-317.
- Chang, F., Cohen, I.S., DiFrancesco, D., Rosen, M.R., and Tromba, C. (1991). Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current *i(f)*. *J Physiol* 440, 367-384.
- Chemin, J., Traboulsie, A., and Lory, P. (2006). Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones. *Cell Calcium* 40, 121-134.
- Chen-Scarabelli, C., and Scarabelli, T.M. (2004). Neurocardiogenic syncope. *BMJ* 329, 336-341.
- Cho, H.-S., Takano, M., and Noma, A. (2003). The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol (Lond)* 550, 169-180.
- Christel, C.J., Cardona, N., Mesirca, P., Herrmann, S., Hofmann, F., Striessnig, J., Ludwig, A., Mangoni, M.E., and Lee, A. (2012). Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in mouse sinoatrial node. *J Physiol* 590, 6327-6342.
- Coppen, S.R., Dupont, E., Rothery, S., and Severs, N.J. (1998). Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res* 82, 232-243.
- Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D., and Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.
- D'Souza, A., Bucchi, A., Johnsen, A.B., Logantha, S.J., Monfredi, O., Yanni, J., Prehar, S., Hart, G., Cartwright, E., Wisloff, U., *et al.* (2014). Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat Commun* 5, 3775.

- Davis, L.M., Rodefeld, M.E., Green, K., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1995). Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol* *6*, 813-822.
- De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M., and Catterall, W.A. (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* *35*, 10392-10402.
- Decher, N., Pirard, B., Bundis, F., Peukert, S., Baringhaus, K.H., Busch, A.E., Steinmeyer, K., and Sanguinetti, M.C. (2004). Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* *279*, 394-400.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., and Theveniau-Ruissy, M. (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res* *81*, 423-437.
- DiFrancesco, D. (1981a). A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* *314*, 359-376.
- DiFrancesco, D. (1981b). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* *314*, 377-393.
- 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*, 434-446.
- DiFrancesco, D., Ducouret, P., and Robinson, R.B. (1989). Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* *243*, 669-671.
- DiFrancesco, D., and Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* *351*, 145-147.
- DiFrancesco, D., and Tromba, C. (1988). Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* *405*, 477-491.
- Dobrzynski, H., Anderson, R.H., Atkinson, A., Borbas, Z., D'Souza, A., Fraser, J.F., Inada, S., Logantha, S.J., Monfredi, O., Morris, G.M., *et al.* (2013). Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol Ther* *139*, 260-288.
- Dobrzynski, H., Boyett, M.R., and Anderson, R.H. (2007). New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* *115*, 1921-1932.
- Dobrzynski, H., Li, J., Tellez, J., Greener, I.D., Nikolski, V.P., Wright, S.E., Parson, S.H., Jones, S.A., Lancaster, M.K., Yamamoto, M., *et al.* (2005). Computer Three-Dimensional Reconstruction of the Sinoatrial Node. *Circulation*.
- Dolphin, A.C. (2012). Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* *13*, 542-555.
- Douplik, C.A. (2017). Venom-derived peptides inhibiting Kir channels: Past, present, and future. *Neuropharmacology* *127*, 161-172.

Dyer, A.R., Persky, V., Stamler, J., Paul, O., Shekelle, R.B., Berkson, D.M., Lepper, M., Schoenberger, J.A., and Lindberg, H.A. (1980). Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 112, 736-749.

Epstein, A.E., DiMarco, J.P., Ellenbogen, K.A., Estes, N.A., 3rd, Freedman, R.A., Gettes, L.S., Gillinov, A.M., Gregoratos, G., Hammill, S.C., Hayes, D.L., *et al.* (2008). ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 51, e1-62.

Ewy, G.A. (2014). Sick sinus syndrome: synopsis. *J Am Coll Cardiol* 64, 539-540.

Gang, U.J., Jons, C., Jorgensen, R.M., Abildstrom, S.Z., Haarbo, J., Messier, M.D., Huikuri, H.V., and Thomsen, P.E. (2010). Heart rhythm at the time of death documented by an implantable loop recorder. *Europace* 12, 254-260.

Gaskell, W.H. (1882). Preliminary Observations on the Innervation of the Heart of the Tortoise. *J Physiol* 3, 369-379.

Gaskell, W.H. (1883). On the Innervation of the Heart, with especial reference to the Heart of the Tortoise. *J Physiol* 4, 43-230 214.

Gauer, R.L. (2011). Evaluation of syncope. *Am Fam Physician* 84, 640-650.

Gauldie, J., Hanson, J.M., Rumjanek, F.D., Shipolini, R.A., and Vernon, C.A. (1976). The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem* 61, 369-376.

Gellens, M.E., George, A.L., Jr., Chen, L.Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R.L., and Kallen, R.G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 554-558.

Giles, W., and Noble, S.J. (1976). Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. *J Physiol* 261, 103-123.

Goldin, A.L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63, 871-894.

Gros, D.B., and Jongsma, H.J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719-730.

Guo, J., and Noma, A. (1997). Existence of a low-threshold and sustained inward current in rabbit atrio-ventricular node cells. *Jpn J Physiol* 47, 355-359.

Guo, J., Ono, K., and Noma, A. (1995). A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 483 (Pt 1), 1-13.

Hagiwara, N., Irisawa, H., and Kameyama, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 395, 233-253.

Hamaguchi, S., Kawakami, Y., Honda, Y., Nemoto, K., Sano, A., Namekata, I., and Tanaka, H. (2013). Developmental changes in excitation-contraction mechanisms of the mouse ventricular myocardium as revealed by functional and confocal imaging analyses. *J Pharmacol Sci* 123, 167-175.

- Hancox, J., and Levi, A. (1994). The hyperpolarisation-activated current, I(f), is not required for pacemaking in single cells from the rabbit atrioventricular node. *Pflugers Arch* 427, 121-128.
- Hashimoto, N., Yamashita, T., and Tsuruzoe, N. (2006). Tertiapin, a selective IKACH blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol Res* 54, 136-141.
- Holm, H., Gudbjartsson, D.F., Sulem, P., Masson, G., Helgadóttir, H.T., Zanon, C., Magnusson, O.T., Helgason, A., Saemundsdóttir, J., Gylfason, A., *et al.* (2011). A rare variant in MYH6 is associated with high risk of sick sinus syndrome. *Nat Genet* 43, 316-320.
- Honjo, H., Boyett, M.R., Kodama, I., and Toyama, J. (1996). Correlation between electrical activity and the size of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 496 (Pt 3), 795-808.
- Hu, K., Qu, Y., Yue, Y., and Boutjdir, M. (2004). Functional basis of sinus bradycardia in congenital heart block. *Circ Res* 94, e32-38.
- James, T.N. (2003). Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: part II--function. *Prog Cardiovasc Dis* 45, 327-360.
- Jensen, P.N., Gronroos, N.N., Chen, L.Y., Folsom, A.R., deFilippi, C., Heckbert, S.R., and Alonso, A. (2014). Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general population. *J Am Coll Cardiol* 64, 531-538.
- Jin, W., Klem, A.M., Lewis, J.H., and Lu, Z. (1999). Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q. *Biochemistry* 38, 14294-14301.
- Jin, W., and Lu, Z. (1998). A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 37, 13291-13299.
- Jin, W., and Lu, Z. (1999). Synthesis of a stable form of tertiapin: a high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 38, 14286-14293.
- Jones, S.A., Boyett, M.R., and Lancaster, M.K. (2007). Declining into failure: the age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node. *Circulation* 115, 1183-1190.
- Kalcheva, N., Qu, J., Sandeep, N., Garcia, L., Zhang, J., Wang, Z., Lampe, P.D., Suadicani, S.O., Spray, D.C., and Fishman, G.I. (2007). Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis in a murine model of oculodentodigital dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20512-20516.
- Kanjhan, R., Coulson, E.J., Adams, D.J., and Bellingham, M.C. (2005). Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 1353-1361.
- Kannel, W.B., Kannel, C., Paffenbarger, R.S., Jr., and Cupples, L.A. (1987). Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am Heart J* 113, 1489-1494.
- Keith, A., and Flack, M. (1907). The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *J Anat Physiol* 41, 172-189.
- Kennedy, M.E., Nemej, J., Corey, S., Wickman, K., and Clapham, D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein-gated potassium channels. *J Biol Chem* 274, 2571-2582.

- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., and Shin, H.S. (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, 35-45.
- Kiviniemi, M.S., Pirnes, M.A., Eranen, H.J., Kettunen, R.V., and Hartikainen, J.E. (1999). Complications related to permanent pacemaker therapy. *Pacing Clin Electrophysiol* 22, 711-720.
- Kristensen, L., Nielsen, J.C., Pedersen, A.K., Mortensen, P.T., and Andersen, H.R. (2001). AV block and changes in pacing mode during long-term follow-up of 399 consecutive patients with sick sinus syndrome treated with an AAI/AAIR pacemaker. *Pacing Clin Electrophysiol* 24, 358-365.
- Leoni, A.L., Gavillet, B., Rougier, J.S., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., Schott, J.J., Demolombe, S., Bruneval, P., Huang, C.L., *et al.* (2010). Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PLoS One* 5, e9298.
- Li, J., Stevens, L., Klugbauer, N., Wray, D. (2004). Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels. *J Biol Chem*, 26858-67.
- Li, Y., Wang, F., Zhang, X., Qi, Z., Tang, M., Szeto, C., Zhang, H., and Chen, X. (2012). beta-Adrenergic stimulation increases Cav3.1 activity in cardiac myocytes through protein kinase A. *PLoS One* 7, e39965.
- Liao, Z., Lockhead, D., Larson, E.D., and Proenza, C. (2010). Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J Gen Physiol* 136, 247-258.
- Lown, B. (1967). Electrical reversion of cardiac arrhythmias. *Br Heart J* 29, 469-489.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., and Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393, 587-591.
- Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5543-5548.
- Mangoni, M.E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2006a). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol* 90, 38-63.
- Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88, 919-982.
- Mangoni, M.E., Traboulsie, A., Leoni, A.L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H.S., *et al.* (2006b). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res* 98, 1422-1430.
- Mangrum, J.M., and DiMarco, J.P. (2000). The evaluation and management of bradycardia. *N Engl J Med* 342, 703-709.

Marger, L., Bouly, M., Malhberg-Gaudin, F., Cohen-Solal, A., Leoni, A., Kupfer, E., Striessnig, J., Nargeot, J., and Mangoni, M.E. (2007). Physiological effects of I(f) inhibition by ivabradine in mice lacking L-type Cav1.3 calcium channels: a differential role for HCN and Cav1.3 channels in the genesis and regulation of heart rate. Paper presented at: European Society of Cardiology Conference (Vienna).

Marger, L., Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A., Dubel, S., Engeland, B., Kanani, S., Fontanaud, P., Striessnig, J., Shin, H.S., *et al.* (2011a). 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.

Marger, L., Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A., Dubel, S., Engeland, B., Kanani, S., Fontanaud, P., Striessnig, J., Shin, H.S., *et al.* (2011b). Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells. *Channels (Austin)* 5, 241-250.

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

Matsuo, J., Nakamura, Y., Izumi-Nakaseko, H., Ando, K., Sekino, Y., and Sugiyama, A. (2015). Possible effects of inhibition of IKr and IKs on field-potential waveforms in the human iPS cell-derived cardiomyocytes sheet. *J Pharmacol Sci* 128, 92-95.

Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A.G., Muller, J.C., Marger, L., Rollin, A., Marquilly, C., Vincent, A., Dubel, S., Bidaud, I., *et al.* (2014). Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of 'funny' (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat Commun* 5, 4664.

Mesirca, P., Bidaud, I., Briec, F., Evain, S., Torrente, A.G., Le Quang, K., Leoni, A.L., Baudot, M., Marger, L., Chung You Chong, A., *et al.* (2016a). 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.

Mesirca, P., Bidaud, I., and Mangoni, M.E. (2016b). Rescuing cardiac automaticity in L-type Cav1.3 channelopathies and beyond. *J Physiol* 594, 5869-5879.

Mesirca, P., Marger, L., Toyoda, F., Rizzetto, R., Audoubert, M., Dubel, S., Torrente, A.G., Difrancesco, M.L., Muller, J.C., Leoni, A.L., *et al.* (2013). The G-protein-gated K⁺ channel, IKACH, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *J Gen Physiol* 142, 113-126.

Mesirca, P., Torrente, A.G., Bidaud, I., Baudot, M., Nargeot, J., and Mangoni, M.E. (2018). [Genesis of cardiac sinus automaticity and therapeutic perspectives]. *Arch Mal Coeur Vaiss Pratique* 2018, 35-39.

Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H.V., Abran, P., Jongasma, H., Nargeot, J., and Gros, D. (2004). Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res* 63, 77-86.

Mitsuiye, T., Shinagawa, Y., and Noma, A. (2000). Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res* 87, 88-91.

Monfredi, O., and Boyett, M.R. (2015). Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons - A view from the sinoatrial nodal myocyte. *J Mol Cell Cardiol*.

- Monfredi, O., Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2013). Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda)* 28, 74-92.
- Moorman, A.F., de Jong, F., Denyn, M.M., and Lamers, W.H. (1998). Development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 82, 629-644.
- Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Muller, J., Stuess, M., Marais, E., Schulla, V., Lacinova, L., *et al.* (2005). Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 25, 9883-9892.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 22, 6027-6034.
- Moya, A., Sutton, R., Ammirati, F., Blanc, J.J., Brignole, M., Dahm, J.B., Deharo, J.C., Gajek, J., Gjesdal, K., Krahn, A., *et al.* (2009). Guidelines for the diagnosis and management of syncope (version 2009). *Eur Heart J* 30, 2631-2671.
- Nanou, E., and Catterall, W.A. (2018). Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* 98, 466-481.
- Noble, D. (1960). Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations. *Nature* 188, 495-497.
- Noble, D. (1966). Applications of Hodgkin-Huxley equations to excitable tissues. *Physiol Rev* 46, 1-50.
- Noma, A., and Trautwein, W. (1978). Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch* 377, 193-200.
- Opthof, T. (2000). The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res* 45, 177-184.
- Oudit, G.Y., Korley, V., Backx, P.H., and Dorian, P. (2007). Lithium-induced sinus node disease at therapeutic concentrations: linking lithium-induced blockade of sodium channels to impaired pacemaker activity. *Can J Cardiol* 23, 229-232.
- Papadatos, G.A., Wallerstein, P.M., Head, C.E., Ratcliff, R., Brady, P.A., Benndorf, K., Saumarez, R.C., Trezise, A.E., Huang, C.L., Vandenberg, J.I., *et al.* (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6210-6215.
- Patton, D.E., Isom, L.L., Catterall, W.A., and Goldin, A.L. (1994). The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 269, 17649-17655.
- Pennisi, D.J., Rentschler, S., Gourdie, R.G., Fishman, G.I., and Mikawa, T. (2002). Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int J Dev Biol* 46, 765-775.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83, 117-161.

- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* *102*, 89-97.
- Postea, O., and Biel, M. (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 903-914.
- Ramadan, O., Qu, Y., Wadgaonkar, R., Baroudi, G., Karnabi, E., Chahine, M., and Boutjdir, M. (2009). Phosphorylation of the consensus sites of protein kinase A on alpha1D L-type calcium channel. *J Biol Chem* *284*, 5042-5049.
- Ramu, Y., Klem, A.M., and Lu, Z. (2001). Titration of tertiapin-Q inhibition of ROMK1 channels by extracellular protons. *Biochemistry* *40*, 3601-3605.
- Ramu, Y., Klem, A.M., and Lu, Z. (2004). Short variable sequence acquired in evolution enables selective inhibition of various inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* *43*, 10701-10709.
- Ramu, Y., Xu, Y., and Lu, Z. (2008). Engineered specific and high-affinity inhibitor for a subtype of inward-rectifier K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10774-10778.
- Ravens, U., Poulet, C., Wettwer, E., and Knaut, M. (2013). Atrial selectivity of antiarrhythmic drugs. *J Physiol* *591*, 4087-4097.
- Rohr, S. (2004). Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* *62*, 309-322.
- Rosati, B., Dun, W., Hirose, M., Boyden, P.A., and McKinnon, D. (2007). Molecular basis of the T- and L-type Ca²⁺ currents in canine Purkinje fibres. *J Physiol* *579*, 465-471.
- Rosen, M.R. (2014). Gene therapy and biological pacing. *N Engl J Med* *371*, 1158-1159.
- Royer, A., van Veen, T.A., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbili, V., Leoni, A.L., Steenman, M., van Rijen, H.V., Demolombe, S., Goddard, C.A., *et al.* (2005). Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* *111*, 1738-1746.
- Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., and Keating, M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* *81*, 299-307.
- Sanguinetti, M.C., and Jurkiewicz, N.K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* *96*, 195-215.
- Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* *93*, 717-729.
- Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., *et al.* (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J* *22*, 3844-3854.

- Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U.B., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* *111*, 1537-1545.
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., and Kaupp, U.B. (1999). Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9391-9396.
- Severs, N.J., Dupont, E., Coppin, S.R., Halliday, D., Inett, E., Baylis, D., and Rothery, S. (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta* *1662*, 138-148.
- Shinagawa, Y., Satoh, H., and Noma, A. (2000). The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol (Lond)* *523 Pt 3*, 593-605.
- Short, D.S. (1954). The syndrome of alternating bradycardia and tachycardia. *Br Heart J* *16*, 208-214.
- Silverman, M.E., Grove, D., and Upshaw, C.B., Jr. (2006). Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation* *113*, 2775-2781.
- Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renstrom, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschutz, R., *et al.* (2004). Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* *113*, 1430-1439.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2003a). 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*, 15235-15240.
- Stieber, J., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2004). Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* *14*, 23-28.
- Stieber, J., Stockl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., and Hofmann, F. (2005). Functional Expression of the Human HCN3 Channel. *J Biol Chem* *280*, 34635-34643.
- Stieber, J., Thomer, A., Much, B., Schneider, A., Biel, M., and Hofmann, F. (2003b). Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4. *J Biol Chem* *278*, 33672-33680.
- Striessnig, J., and Koschak, A. (2008). Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca²⁺ channels with gene knockout models. *Channels (Austin)* *2*, 233-251.
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., and Tuluc, P. (2014). L-type Ca(2+) channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* *3*, 15-38.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A., and Numa, S. (1988). Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* *336*, 134-139.
- Tawara, S. (1906). *Das Reizleitungssystem des Säugethierherzens*. (Jena: Gustav Fischer).
- Toyoda, F., Ding, W.G., and Matsuura, H. (2005). Responses of the sustained inward current to autonomic agonists in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *Br J Pharmacol* *144*, 660-668.

Toyoda, F., Mesirca, P., Dubel, S., Ding, W.G., Striessnig, J., Mangoni, M.E., and Matsuura, H. (2017). CaV1.3 L-type Ca²⁺ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na⁺ current. *Sci Rep* 7, 7869.

Vaccari, T., Moroni, A., Rocchi, M., Gorza, L., Bianchi, M.E., Beltrame, M., and DiFrancesco, D. (1999). The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1446, 419-425.

van Kempen, M., van Ginneken, A., de Grijs, I., Mutsaers, N., Opthof, T., Jongasma, H., and van der Heyden, M. (2003). Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cell Physiol Biochem* 13, 263-270.

van Veen, T.A., Stein, M., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Colledge, W.H., Huang, C.L., Wilders, R., Grace, A.A., Escande, D., *et al.* (2005). Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 112, 1927-1935.

Verheijck, E.E., Wessels, A., van Ginneken, A.C., Bourier, J., Markman, M.W., Vermeulen, J.L., de Bakker, J.M., Lamers, W.H., Opthof, T., and Bouman, L.N. (1998). Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. *Circulation* 97, 1623-1631.

Viscomi, C., Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Moroni, A., and DiFrancesco, D. (2001). C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 276, 29930-29934.

Walsh, K.B. (2011). Targeting GIRK Channels for the Development of New Therapeutic Agents. *Front Pharmacol* 2, 64.

Warmke, J.W., and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3438-3442.

Wickman, K., and Clapham, D.E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 75, 865-885.

Wickman, K., Krapivinsky, G., Corey, S., Kennedy, M., Nemeč, J., Medina, I., and Clapham, D.E. (1999). Structure, G protein activation, and functional relevance of the cardiac G protein-gated K⁺ channel, IKACH. *Ann N Y Acad Sci* 868, 386-398.

Wickman, K., Nemeč, J., Gendler, S.J., and Clapham, D.E. (1998). Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 20, 103-114.

Xu, X., and Nelson, J.W. (1993). Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proteins* 17, 124-137.

Yamada, M., Inanobe, A., and Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 50, 723-760.

Yanagihara, K., Noma, A., and Irisawa, H. (1980). Reconstruction of sino-atrial node pacemaker potential based on the voltage clamp experiments. *Jpn J Physiol* 30, 841-857.

Yeh, Y.H., Burstein, B., Qi, X.Y., Sakabe, M., Chartier, D., Comtois, P., Wang, Z., Kuo, C.T., and Nattel, S. (2009). Funny current downregulation and sinus node dysfunction associated with

atrial tachyarrhythmia: a molecular basis for tachycardia-bradycardia syndrome. *Circulation* 119, 1576-1585.

Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4, 207.

Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A.C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67, 821-870.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tables des différents paramètres mesurés selon les génotypes.

| WT | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|---|
| NaCl | Pre (10) | 624 ± 19 | 34 ± 1 | 15 ± 5 ^{####} vs Tert 5 vs Tert 1 |
| | Post (10) | 638 ± 22 | 33 ± 1 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Pre (5) | 578 ± 4 | 34 ± 2 | 14 ± 8 ^{##} vs Tert 5 vs Tert 1 |
| | Post (5) | 599 ± 26 | 34 ± 1 | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (12) | 605 ± 21* | 32 ± 1 | 61 ± 8 |
| | Post (12) | 654 ± 11 | 32 ± 1 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (19) | 588 ± 9*** | 33 ± 1 | 86 ± 12 ^{##} vs Atrop |
| | Post (19) | 648 ± 12 | 33 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (10) | 622 ± 21* | 35 ± 1** | 29 ± 5 |
| | Post (10) | 669 ± 24 | 34 ± 1 | |

| $Ca_v1.3^{-/-}$ | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|-------------------------|-----------|--------------|------------|--|
| NaCl | Pre (11) | 461 ± 21 | 48 ± 3 | 20 ± 4 ^{#####} vs Tert 5 vs Tert 1 |
| | Post (11) | 437 ± 28 | 47 ± 2 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Pre (13) | 439 ± 13** | 46 ± 2 | 23 ± 5 ^{#####} vs Tert 5 vs Tert 1 |
| | Post (13) | 511 ± 14 | 46 ± 2 | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (15) | 440 ± 12** | 53 ± 3*** | 60 ± 8 |
| | Post (15) | 487 ± 16 | 48 ± 2 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (15) | 452 ± 13**** | 50 ± 2** | 123 ± 18 ^{##} vs Atrop |
| | Post (15) | 549 ± 11 | 46 ± 2 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (10) | 422 ± 15* | 49 ± 2** | 32 ± 3 |
| | Post (10) | 496 ± 13 | 46 ± 2 | |

| $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|-------------------------------|-----------|-------------|------------|---------------------------------|
| NaCl | Pre (7) | 475 ± 19 | 54 ± 3 | 23 ± 5 ^{###} vs Tert 5 |
| | Post (7) | 464 ± 33 | 54 ± 3 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Pre (9) | 439 ± 16* | 57 ± 2 | 29 ± 6 ^{##} vs Tert 5 |
| | Post (9) | 495 ± 22 | 56 ± 4 | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (10) | 432 ± 10* | 58 ± 3** | 57 ± 16 |
| | Post (10) | 487 ± 19 | 52 ± 3 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (11) | 427 ± 9**** | 55 ± 2* | 131 ± 16 ^{##} vs Atrop |
| | Post (11) | 542 ± 11 | 49 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (10) | 441 ± 13** | 57 ± 2* | 31 ± 4 |
| | Post (10) | 519 ± 28 | 51 ± 3 | |

| AVB/60 | $Ca_v1.3^{-/-}$ | | | $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ | | |
|----------------------|-----------------|-------|----|-------------------------------|---------|----|
| | PRE | POST | n | PRE | POST | n |
| NaCl | 8 ± 5 | 6 ± 3 | 11 | 30 ± 11 | 29 ± 12 | 7 |
| Tert 5 (5 mg/kg) | 9 ± 3*** | 0 ± 0 | 15 | 25 ± 10**** | 4 ± 2 | 11 |
| Atrop (0.5 mg/kg) | 4 ± 2 | 1 ± 1 | 11 | 24 ± 11** | 4 ± 2 | 10 |

| Ca_v3.1^{-/-} | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|--|-----------------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| NaCl | Pre (9) | 609 ± 22 | 33 ± 1 | $27 \pm 8^{\#\#}$ vs Tert 5 |
| | Post (9) | 637 ± 21 | 33 ± 1 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | | | | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (7) | 624 ± 20 | 34 ± 1 | 58 ± 11 |
| | Post (7) | 642 ± 27 | 33 ± 1 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (4) | 605 ± 23 | 34 ± 1 | $113 \pm 23^{\#}$ vs Atrop |
| | Post (4) | 669 ± 11 | 33 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (5) | $595 \pm 13^*$ | $36 \pm 1^*$ | 27 ± 6 |
| | Post (5) | 636 ± 22 | 34 ± 1 | |

| HCN4-CNBD | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|---------------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| NaCl | Pre (8) | 585 ± 22 | 37 ± 1 | $22 \pm 3^{\#\#}$ vs Tert 5 |
| | Post (8) | 578 ± 20 | 37 ± 1 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | | | | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | | | | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (8) | $556 \pm 16^{**}$ | $39 \pm 1^*$ | $138 \pm 41^{\#}$ vs Atrop |
| | Post (8) | 633 ± 19 | 35 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (8) | $568 \pm 18^*$ | 37 ± 1 | 31 ± 8 |
| | Post (8) | 615 ± 13 | 36 ± 1 | |

| Girk4^{-/-}/Cav1.3^{-/-} | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|---|-----------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| NaCl | Pre (6) | 530 ± 17 | 44 ± 1 | 27 ± 6 |
| | Post (6) | 534 ± 17 | 44 ± 1 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Pre (6) | 503 ± 22 | 44 ± 1 | 22 ± 9 |
| | Post (6) | 550 ± 28 | 42 ± 1 | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (6) | 515 ± 24 | 43 ± 3 | 27 ± 7 |
| | Post (6) | 522 ± 21 | 43 ± 2 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (11) | 504 ± 14 | 44 ± 1 | 25 ± 5 |
| | Post (11) | 518 ± 18 | 44 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (6) | 466 ± 23* | 47 ± 1** | 27 ± 5 |
| | Post (6) | 540 ± 12 | 43 ± 1 | |

| Girk4^{-/-} | | HR (bpm) | PR (ms) | Effect Duration (min) |
|----------------------------|-----------|---------------------|--------------------|----------------------------------|
| NaCl | Pre (6) | 688 ± 14 | 31 ± 1 | 17 ± 5 |
| | Post (6) | 696 ± 15 | 32 ± 1 | |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Pre (6) | 689 ± 16 | 31 ± 1 | 18 ± 7 |
| | Post (6) | 722 ± 9 | 32 ± 1 | |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Pre (6) | 687 ± 22 | 30 ± 1 | 17 ± 3 |
| | Post (6) | 694 ± 23 | 31 ± 1 | |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Pre (11) | 655 ± 6 | 31 ± 1 | 19 ± 4 |
| | Post (11) | 637 ± 22 | 31 ± 1 | |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Pre (6) | 658 ± 22** | 33 ± 1 | 22 ± 3 |
| | Post (6) | 708 ± 14 | 31 ± 1 | |

| Scn5a^{+/-} | | HR (bpm) | PR (ms) | QRS (ms) | Effect Duration (min) |
|---------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------------------------|
| NaCl | Ctrl (11) | 533 ± 20 | 34 ± 1* | 15 ± 1**** | 39 ± 6#### vs Tert 5 |
| | Mut (16) | 531 ± 15 | 38 ± 1 | 18 ± 1 | 42 ± 13#### vs Tert 5 § vs Tert 1 |
| Tert 0.1 (0.1 mg/kg) | Ctrl (12) | 516 ± 19 | 34 ± 1* | 15 ± 1**** | 40 ± 7#### vs Tert 5 |
| | Mut (20) | 539 ± 12 | 38 ± 1 | 18 ± 1 | 41 ± 8#### vs Tert 5 § vs Tert 1 |
| Tert 1 (1 mg/kg) | Ctrl (12) | 543 ± 13 | 34 ± 1* | 15 ± 1*** | 79 ± 15## vs Tert 5 |
| | Mut (18) | 532 ± 9 | 37 ± 1 | 18 ± 1 | 91 ± 12 |
| Tert 5 (5 mg/kg) | Ctrl (12) | 519 ± 9 | 35 ± 1 | 16 ± 1** | 156 ± 24#### vs Atrop |
| | Mut (19) | 514 ± 13 | 36 ± 1 | 19 ± 1 | 125 ± 15\$\$ vs Atrop |
| Atrop (0.5 mg/kg) | Ctrl (8) | 562 ± 19 | 33 ± 2 | 15 ± 1** | 54 ± 3 |
| | Mut (7) | 562 ± 13 | 34 ± 2 | 19 ± 1 | 52 ± 5 |

| Scn5a^{+/-} | | HR (bpm) | PR (ms) | QRS (ms) |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Ctrl | NaCl (11) | 533 ± 20* | 34 ± 1* | 16 ± 1 |
| | Atrop 0.5 mg/kg (8) | 597 ± 19 | 31 ± 2 | 15 ± 1 |
| Mut | NaCl (16) | 531 ± 15* | 38 ± 1* | 18 ± 1 |
| | Atrop 0.5 mg/kg (8) | 582 ± 15 | 32 ± 1 | 19 ± 1 |



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 Margeat^{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 $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} channels ($\text{Ca}_v1.3^{-/-}$) 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 $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice. We found that genetic inactivation of I_{KACH} abolished SSS symptoms in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ 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 $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice or following selective inhibition of $\text{Ca}_v1.3$ -mediated L-type Ca^{2+} (I_{CaL}) 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 | $\text{Ca}_v1.3$

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 $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} channels is central in some inherited forms of SSS. For instance, loss of function in $\text{Ca}_v1.3$ -mediated L-type Ca^{2+} (I_{CaL}) 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 $\text{Ca}_v1.3$ channels (11). The relevance of $\text{Ca}_v1.3$ channels to SSS is demonstrated also by work on the pathophysiology of congenital heart block, where down-regulation of $\text{Ca}_v1.3$ 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 $\text{Ca}_v1.3$ -mediated I_{CaL} (13).

In mice and humans, $\text{Ca}_v1.3$ channels are expressed in the SAN, atria, and the AV node but are absent in adult ventricular tissue (14, 15). $\text{Ca}_v1.3$ -mediated I_{CaL} 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

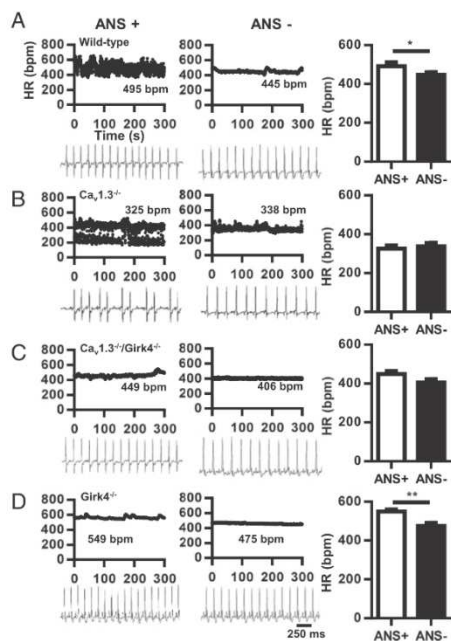


Fig. 1. Dependence of heart block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice on autonomic nervous system (ANS) activity. (A) Dot plot of beat-to-beat variability [heart rate (HR) in bpm] of heart rate (Top) and representative samples of telemetric ECG recordings (Bottom) from WT mice before (Left, ANS+) and after (Right, 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_{KACb} 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_{KACb} rescued SSS and heart block of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice without reducing heart rate regulation.

The I_{KACb} 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_{KACb} inhibition (SI Appendix, Fig. S3). We also tested whether I_{KACb} 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_{KACb} was effective in antagonizing drug-induced bradycardia (SI Appendix, Fig. S4 B and C). Taken together, these observations demonstrated that I_{KACb} 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_{KACb} 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_{KACb} channels (20, 28, 29). Release of adenosine can worsen SSS by leading to excessive bradycardia (30). We thus assessed the capability of I_{KACb} 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_{KACb} ablation for preventing excessive A₁R-induced bradycardia in SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ mice.

I_{KACb} 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_{KACb} shortened the AV refractory period and the Wenckebach cycle length of $Ca_v1.3^{-/-}$ mice (SI Appendix, Table S4). Concurrent inactivation of I_{KACb} 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 arrhythmias 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_{KACb} deletion could rescue tachycardia-bradycardia syndrome and AV block in the $Ca_v1.3^{-/-}$ mouse model of SSS.

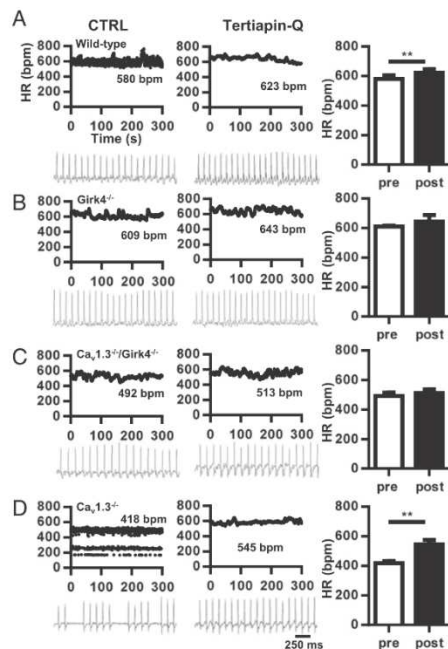


Fig. 2. Effect of the I_{KACb} blocker tertiapin-Q on bradycardia and heart block in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. (A) Dot plot of beat-to-beat variability (HR in bpm) of heart rate (Top) and representative samples of telemetric ECG recordings (Bottom) from WT mice before (Left) and after (Center) i.p. injection 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. ** $P < 0.01$.

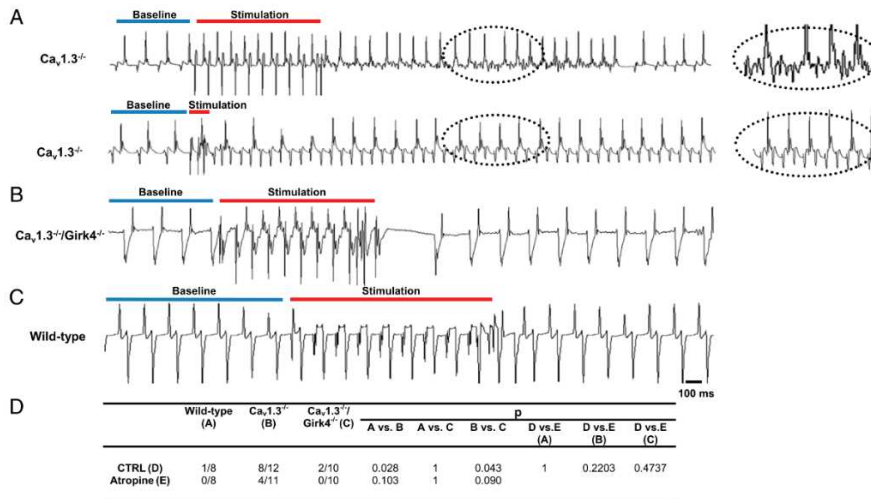


Fig. 3. I_{KACH} ablation suppresses atrial tachyarrhythmias in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. (A) Representative examples of pacing-induced atrial fibrillation (Top) and atrial tachycardia (Bottom) in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. Traces represent intracardiac electrogram recordings before pacing (baseline, blue bar), during pacing (stimulation, red bar), and after pacing. (Insets) Close-up views of arrhythmias recorded after pacing. No atrial fibrillation or atrial tachycardia was recorded in $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} (B) and WT (C) mice after intracardiac atrial stimulation. (D) Statistical analysis of the incidence of pacing-induced arrhythmias. Statistics: Fisher's exact test. CTRL, control.

I_{KACH} Ablation Normalized Action Potential Duration in $Ca_v1.3^{-/-}$ Atrial Myocytes. Supraventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice could be due to an alteration in the atrial action potential. We thus compared the action potential duration of atrial myocytes in the different genotypes to test the ability of I_{KACH} ablation to normalize this parameter of atrial excitability (Fig. 4). WT and Girk4^{-/-} myocytes displayed similar action potential durations (Fig. 4A). In contrast, $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes had shortened action potential durations. However, $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} myocytes displayed normal action potential duration, suggesting that I_{KACH} contributes to action potential repolarization even in the absence of ACh (Fig. 4A–C). Consistent with this hypothesis, tertiapin-Q significantly prolonged the action potential duration of WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes but had no effect on Girk4^{-/-} and $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} myocytes (SI Appendix, Fig. S6). Comparison between I_{KACH} densities of WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes showed that SAN myocytes from KO mice had reduced I_{KACH} (Fig. 4D–H), negating the difference in I_{KACH} density between SAN and atrial myocytes observed in WT mice. These observations showed that genetic ablation or pharmacological blockade of I_{KACH} restored the normal action potential waveform of atrial $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes.

I_{KACH} Ablation Rescued SSS of $Ca_v1.3^{-/-}$ Hearts by Reducing ACh-Induced SAN Bradycardia and AV Block. Because suppression of I_{KACH} significantly reduces the muscarinic regulation of pacemaker activity in SAN myocytes (21), we hypothesized that improvement of SAN rate and AV conduction in $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} mice was due to a decrease in the sensitivity of SAN automaticity and AV conduction to ACh. We thus tested the chronotropic and dromotropic effects of ACh on heart rate and AV conduction in isolated Langendorff-perfused hearts (Fig. 5). Perfusion with 0.3 μ M ACh similarly reduced the

beating rate of WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts (34% in WT, 39% in $Ca_v1.3^{-/-}$). In contrast, $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} hearts showed a reduced chronotropic response to ACh, which was similar to the chronotropic response of Girk4^{-/-} hearts (16% in Girk4^{-/-}, 13% in $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-}; Fig. 5). These results indicated that I_{KACH} ablation was the dominant factor in determining the sensitivity of isolated hearts to ACh. ACh had a similar effect (35–37%) on AV conduction time (PR interval) of WT and Girk4^{-/-} hearts. In contrast, the PR interval of $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts was more than doubled by ACh perfusion (77%), whereas the negative dromotropic effect of ACh on $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} hearts was similar to the dromotropic effect observed in Girk4^{-/-} hearts (29%). These observations indicated that I_{KACH} ablation reduced ACh-mediated negative chronotropic and dromotropic effects, preventing excessive rate reduction and AV block in SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts.

SAN Myocytes from $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} Mice Have Reduced Muscarinic Regulation of Pacemaker Activity. The prominent reduction of ACh-induced SAN dysfunction in isolated SSS $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts prompted us to investigate the impact of I_{KACH} ablation on isolated pacemaker myocytes (Fig. 6). Perfusion of spontaneously beating myocytes with ACh dose-dependently decreased the beating rate of WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, and Girk4^{-/-} myocytes (Fig. 6A, B, and D and SI Appendix, Table S7). In contrast, $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-} SAN myocytes did not show a significant ACh-mediated rate reduction, even in response to 0.05 μ M ACh, a concentration sufficient to stop pacemaking in all WT and $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes (Fig. 6C). This observation indicated that I_{KACH} ablation reduced the negative chronotropic effect mediated by ACh on pacemaker activity in $Ca_v1.3^{-/-}$ myocytes. I_{KACH} ablation also increased the basal spontaneous pacing rate of $Ca_v1.3^{-/-}$ /Girk4^{-/-}

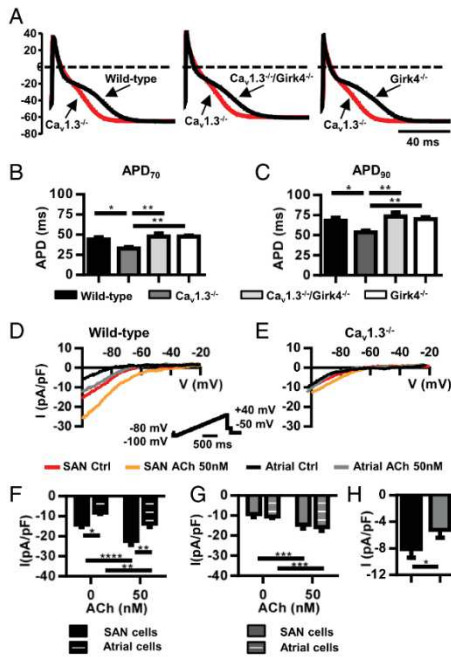


Fig. 4. Normalization of action potential duration of $Ca_v1.3^{-/-}$ atrial myocytes after I_{KACH} ablation. (A) Action potential sample traces of $Ca_v1.3^{-/-}$ atrial myocytes (red trace) overlapped with action potentials from WT (Left), $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ (Middle), or $Girk4^{-/-}$ myocytes (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_{KACH} 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_{KACH} 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_{KACH} 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_{KACH} 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_{CaL} contributed to the cholinergic regulation of pacemaker activity in WT and $Girk4^{-/-}$ SAN.

Genetic or Pharmacological Ablation of I_{KACH} 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_{KACH} 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 tertiapin-Q was added to the perfusion medium (SI Appendix, Fig. S8).

Because I_{KACH} 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_{KACH} 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_{KACH}

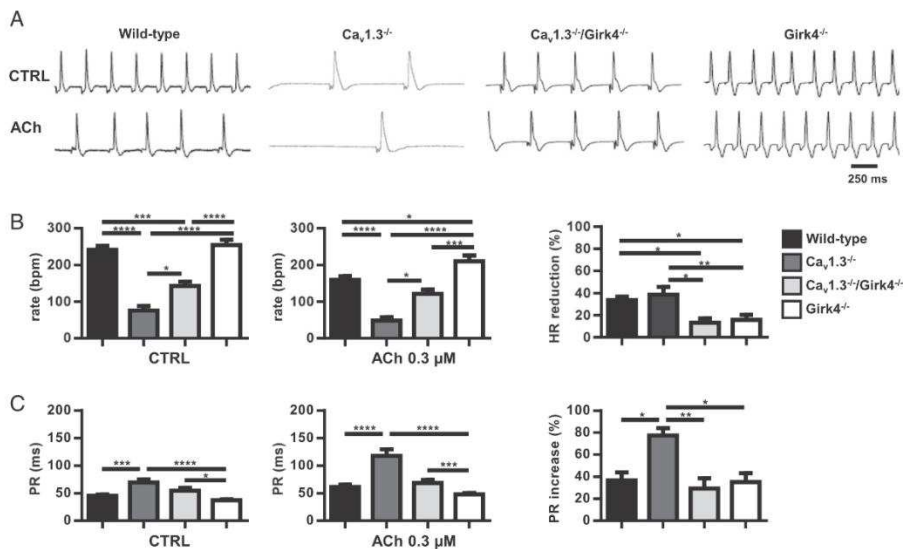


Fig. 5. ACh (0.3 μ M) effect on heart rate and AV conduction in isolated Langendorff-perfused hearts. (A) Representative traces in CTRL conditions (Top) and ACh-perfused (Bottom) hearts from WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$, and $Girk4^{-/-}$ mice. (B) Mean value of heart rate in control (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). (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_{CaL} , rescuing of automaticity in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes under ACh required fully functional RyR-dependent Ca^{2+} 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_{CaL} 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 μ M) 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 $[Ca^{2+}]_i$ release, $Ca_v1.3$ -mediated I_{CaL} 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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_{CaL} in human pathologies of heart rhythm and indicate that $Ca_v1.3^{-/-}$ mice constitute a suitable preclinical model for testing

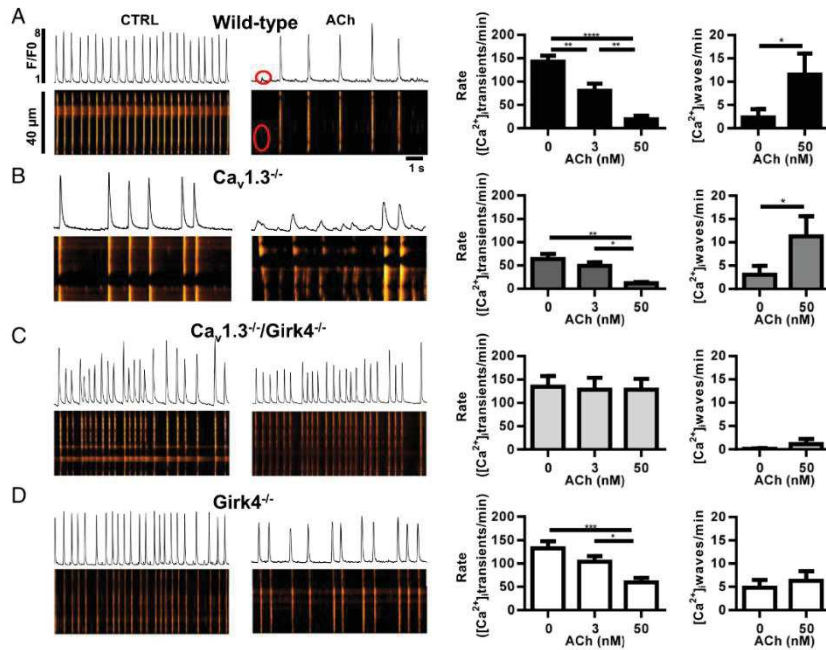


Fig. 7. Suppression of $[Ca^{2+}]_i$ waves in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN myocytes after ablation of I_{KACH} . Sample line scan images (Left), averaged frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients (Middle), and averaged frequency of $[Ca^{2+}]_i$ waves (Right) of $n = 11$ WT (A), $n = 9$ $Ca_v1.3^{-/-}$ (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_{CaT} (47), and I_f (36), are sufficient to drive normal pacemaker activity (Fig. SE). 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_{CaL} could maintain the balance following concurrent loss of inward I_{NCX} and outward I_{KACH} , additional loss of $Ca_v1.3$ -mediated I_{CaL} 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 pre-clinical 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 pharmacotherapeutical 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

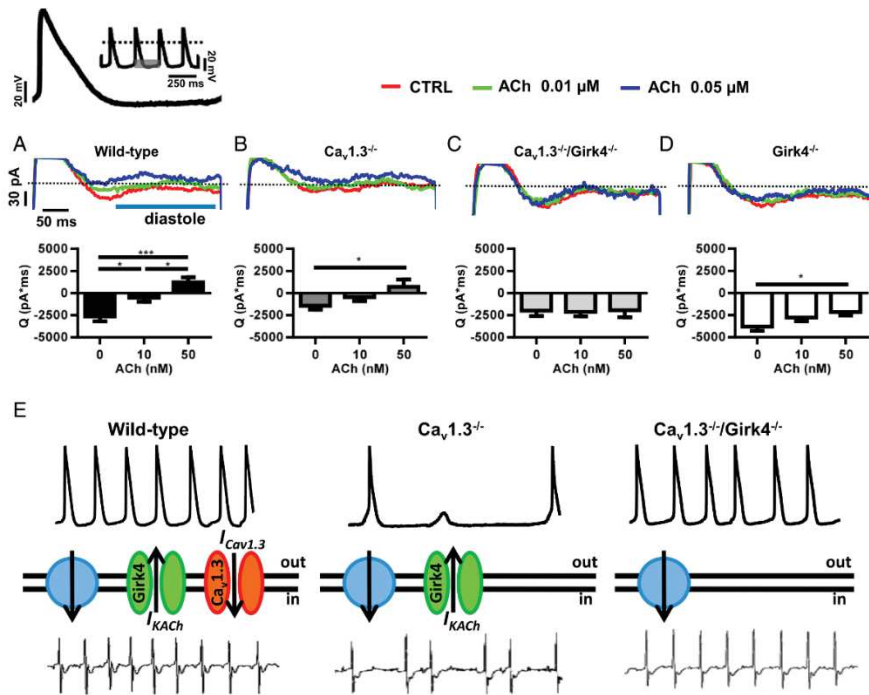


Fig. 8. Diastolic current in isolated $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ SAN myocytes and heart rate determination. Sample traces (Upper) and averaged current time integrals (Bottom) measured between the voltage corresponding to the maximum diastolic potential (-61 mV) and the following 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 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 action 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 $I_{CaV1.3}$, and the blue circle shows the idealized sum of other inward currents involved in the pacemaker mechanism (I_{NaP} , I_{CaT}). (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 >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 Genomique 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).

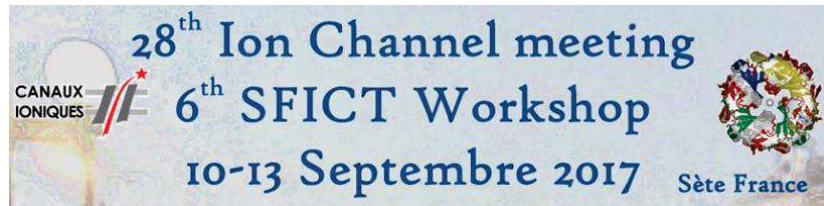
- Sanders P, Lau DH, Kalman JK (2014) Sinus node abnormalities. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, eds Zipes DP, Jalife J (Elsevier Saunders, Philadelphia), 6th Ed, pp 691–696.
- Fish FA, Benson DW (2001) Disorders of cardiac rhythm and conduction. *Moss and Adam's Heart Disease in Infants, Children and Adolescents*, eds Allen HD, Clark HF, 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_1I ($Ca_v1.3$) 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.
- Platzler 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_1I) 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_1I) calcium channel in sinoatrial nodes: Insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 90(9):981–987.
- Wickman K, Nemej 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.
- Krapivinsky 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.
- Bettahi I, Marker CL, Roman MI, 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, Diochot S, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) The bee venom peptide tertipin 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.
- Kirchhoff 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) Ankyrin 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 action 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) Tertipin, 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.
- Choi KL, 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 $Ca_v3.1$ α_1I 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.



- Inhibition of K_{ACh} channels by the bee venom peptide tertiapin-Q rescues sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital sino-atrial dysfunction Antony Chung you Chong, Montpellier



- PC18-0023** Inhibition of K_{ACh} channels by the bee venom peptide tertiapin-Q rescues inherited cardiac conduction defects and sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital dysfunction
A. Chung you Chong¹, I. Bidaud², A. Carcouet², S. De Waard², M. Ronjat², M. De Waard², M. Mangoni², P. Mesirca², F. Charpentier²
¹Physiologie, Institut de Génomique Fonctionnelle CNRS-UMR 5203/INSERM 1191, University of Montpellier, Montpellier - ²Institut du Thorax UMR 1087/CNRS-UMR 6291, University of Nantes, Nantes, France



29th Ion Channel Meeting
 September 9th through 12th, Sète, France

Sunday, September 9th 2018

Selected speaker: Antony Chung You Chong (Montpellier, France): Inhibition of KACH channels by the bee venom peptide tertiapin-Q rescues cardiac conduction and sino-atrial bradycardia in models of congenital bradycardia.



16 H 00: **Antony Chung you Chong**, IGF CNRS UMR 5203, Montpellier. "Inhibition of IK_{ACh} current rescues sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital sino-atrial dysfunction".



9h40 **Antony Chung You Chong**, IGF: "Inhibition of IK_{ACh} current rescues sino-atrial bradycardia and atrioventricular block in models of congenital sino-atrial dysfunction"

Résumé

Correction de la bradycardie et des troubles de conduction dans des modèles de dysfonction congénitale de l'automatisme cardiaque par l'inhibition pharmacologique du courant I_{KACH}

La dysfonction du nœud sinusal (DNS) est l'une des principales pathologies de l'automatisme cardiaque. La DNS désigne une multitude de troubles caractérisée par l'incapacité du nœud sinusal (SAN) à générer ou à conduire l'impulsion cardiaque. La seule thérapie actuellement disponible pour la DNS est l'implantation d'un pacemaker électronique. Des études épidémiologiques prévoient un nombre croissant d'implantation de pacemakers électroniques au cours des 50 prochaines années à cause du vieillissement de la population. Le développement de thérapies innovantes pour la DNS est donc un enjeu médical et sociétal important. Comme notre équipe l'a déjà proposé, l'inhibition pharmacologique du courant potassique activé par l'acétylcholine (I_{KACH}) pourrait constituer une nouvelle option thérapeutique pour traiter la DNS.

Nous avons donc testé l'inhibition du courant I_{KACH} par un peptide extrait du venin d'abeille, la tertiapine-Q, pour corriger le DNS et le dysfonctionnement de la conduction chez des souris modèle de pathologies cardiaque humaine. En particulier, nous avons étudié les souris portant l'inactivation des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ ($Ca_v1.3^{-/-}$), les souris portant simultanément l'ablation de $Ca_v1.3$ et des canaux calciques de type T $Ca_v3.1$ ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$), les souris porteuses d'une perte de fonction des canaux HCN4 (HCN4-CNBD) et les souris haplo-suffisantes $Na_v1.5$ ($Scn5a^{+/-}$). Nous avons enregistré, par télémétrie, l'ECG chez ces modèles murins avant et après l'administration de différentes doses de tertiapine-Q.

L'inhibition du courant I_{KACH} par la tertiapine-Q prévient les dysfonctions sinusales et améliore la conduction auriculo-ventriculaire dans ces modèles de bradycardie congénitale. Nos résultats ouvrent la possibilité d'un développement d'un ciblage pharmacologique d' I_{KACH} afin de parvenir à corriger la DNS et les troubles de la conduction.

Mots clés : Nœud sinusal, activité pacemaker cardiaque, canaux ioniques, maladie rythmique de l'oreillette, courant I_{KACH}