HAL open science

Rôle des canaux calciques de type l cav1.3 et des canaux potassiques activés par les protéines g ikach dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque

Leïla Talssi

▶ **To cite this version:**

Leïla Talssi. Rôle des canaux calciques de type l cav1.3 et des canaux potassiques activés par les protéines g ikach dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT022 . tel-03348038

HAL Id: tel-03348038

https://theses.hal.science/tel-03348038v1

Submitted on 17 Sep 2021

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

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

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

En Electrophysiologie cardiaque

École doctorale Sciences Chimiques et Biologie de la Santé

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

Rôle des canaux calciques de type L $Ca_v1.3$ et des canaux potassiques activés par les protéines G I_{KACh} dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque

Présentée par Leïla TALSSI
Le 05 juillet 2021

Sous la direction de Matteo Elia MANGONI
et Pietro MESIRCA

Devant le jury composé de

Matteo Elia Mangoni, DR, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier	Directeur de thèse
Pietro Mesirca, CR, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier	Co-encadrant de thèse
Ana Maria Gomez, DR, INSERM UMRS-180, Châtenay-Malabry	Rapporteure
Michel De Waard, DR, Institut du thorax, Nantes	Rapporteur et Président
Marcella Rocchetti, Professeur asssociée, Université de Milan-Bicocca, Milan (Italie)	Examinatrice

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Préface

Chaque battement du cœur voit son origine dans l'oreillette droite, qui va générer une impulsion électrique spontané. Cet automatisme est généré par des cardiomyocytes spécialisés appelés « pacemaker » qui contrôlent la fréquence cardiaque.

L'automatisme et la fréquence cardiaque sont sous le contrôle permanent du système nerveux autonome. La voie sympathique va permettre d'augmentation la fréquence cardiaque, alors que la voie parasympathique va la réduire. Cette étude permet de mettre en lumière les rôles de deus canaux ioniques particulier, les canaux de type L $Ca_v1.3$ et les canaux I_{KACh} dans la régulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux parasympathique.

Remerciements

Matteo, Pietro, merci. Merci de m'avoir laissé ma chance dès 2016 lorsque je cherchais un stage. Lors de ce stage, j'ai découvert une équipe qui m'a confiance et en qui j'ai eu confiance. Pour en arriver là, 5 ans plus tard, à la fin d'une thèse. Merci pour l'encadrement, la disponibilité et pour tout ce que j'ai pu apprendre durant cette expérience (merci d'avoir également enrichi mon italien dans un certain registre, c'est toujours utile dans la vie).

Isa, merci pour ta disponibilité, tes encouragements, ta pédagogie, ainsi que pour toutes les discussions qu'on a pu avoir et ta bonne humeur au quotidien.

Angelo, merci pour les discussions, et tous ces petits moments de partage dans le bureau ou le labo.

Julien, Charlotte, Eleonora, Matthias, Manon, il y en a certain que j'ai connu plus que d'autres, et certains qui ne sont plus là d'ailleurs, mais merci pour votre bonne humeur, les rires, les pauses et les grands moments dans le bureau ou le labo.

Merci également au reste de l'équipe Barrère, Stéphanie, Christian, Laura, Aurélie, Anne, Carlota, merci pour votre présence, de vos conseils et de votre bienveillance.

Nathalie et Monia, mes petites vipères, merci d'avoir toujours été là, et merci au labo ! Sans lui, tout ceci ne serait clairement pas arrivé !

Angelina (direction Jupiter), Berliozo (notre plus gros flex), Vincent, Pola, Lucile et tous les autres, merci pour tous ces moments, les fous rires, les pauses et le soutien régulier qui a rendu cette thèse bien plus sympa et bien plus agréable !

Hubert, Sophie, Flavien, Sarah, merci mes petits keurs, merci d'être là depuis…depuis déjà longtemps !

Papa, Maman, il est loin le temps du bac et des doutes non ? Merci, je pense qu'il est inutile de développer. Audrey, Cédric, s'il vous plait, si un jour Yaya veut aller vers la science, s'il vous plait, envoyez-la-moi ! Et puis merci Nanou, d'être là et d'être toi, tout simplement.

Ma dernière pensée est pour René, peut-être que sans toi je n'aurais jamais pris ce chemin.

Résumé

L'automatisme cardiaque est généré dans le nœud sino-atrial par des cardiomyocytes spécialisés appelés cellules « pacemaker ». Ces cellules sont douées d'une activité électrique spontanée qui est sous le contrôle de la régulation par le système nerveux autonome qui en régule sa fréquence. La régulation sympathique est médiée par les récepteurs β1/2 et la régulation cholinergique par l'activation dépendante de l'acétylcholine (ACh) des récepteurs muscariniques M2. Les récepteurs M2 sont couplés à une protéine Gi. Une fois les récepteurs muscariniques activés, la sous-unité βγ active directement les canaux GIRK1/4 augmentant ainsi le courant K^+ I_{KACh}, tandis que la sous-unité αi inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (AC). L'inhibition de l'AC diminue la production d'AMPc intracellulaire affectant directement (via le domaine de liaison des nucléotides cycliques, CNBD, des canaux HCN) ou indirectement via la protéine Kinase A (PKA) l'activité des canaux ioniques voltage-dépendants impliqués dans le pacemaking cardiaque, principalement HCN4 (responsable du courant I_f) et les canaux Ca^{2+} de type L ($I_{Ca,L}$). Deux isoformes de canaux Ca^{2+} de type L sont exprimées dans les cellules du pacemaker du nœud sinusal : $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$. Toutefois, seuls les canaux $Ca_v1.3$ sont ouverts à de potentiels de membrane diastoliques, fournissant ainsi un courant entrant pendant la dépolarisation diastolique. Les canaux de type L $Ca_v1.3$ sont donc un effecteur potentiellement important de la régulation cholinergique de l'activité du pacemaker cardiaque, mais leur rôle n'a pas été étudié directement.

Les expérimentations, en patch-clamp et cœur isolé-perfusé, mais également par l'enregistrement d'électrocardiogramme *in vivo* par télémétrie a permis de mettre en évidence deux points importants. L'ablation concomitante de I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$ et de I_{KACh} porté par GIRK1/4 empêche la régulation cholinergique de l'activité pacemaker après une stimulation β-adrénergique. Ceci montre une interaction fonctionnelle entre $Ca_v1.3$ et GIRK1/4 dans la régulation cholinergique. Il est également apparu que les courants de type L portés par $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$ sont tous les deux sensibles à l'Acétylcholine. Toutefois, $Ca_v1.3$ présente une sensibilité à de faibles doses tandis que $Ca_v1.2$ à de forte dose. Ce résultat suggère que les canaux $Ca_v1.2$ pourraient participer à la régulation cholinergique à tonus vagal élevé.

En conclusion, les canaux $Ca_v1.3$ et GIRK1/4 jouent un rôle important dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque chez la souris.

Mots clés : Nœud sino-atrial, pacemaker, automatisme cardiaque, canaux calciques, régulation du système nerveux parasympathique, régulation cholinergique

Abstract

Cardiac automaticity is generated in the sino-atrial node by specialized cardiomyocytes called "pacemaker" cells. Spontaneous activity is permanently controlled by the autonomic nervous system, which regulates its frequency. Sympathetic regulation is mediated by β1/2 receptors and cholinergic regulation by acetylcholine (ACh)-dependent activation of M2 muscarinic receptors. M2 receptors are coupled to a Gi protein. When muscarinic receptors are activated, the βγ subunit directly activates GIRK1/4 channels thereby opening K^+ I_{KACh} current, whereas the αi subunit inhibits adenylate cyclase (AC) activity. Inhibition of AC decreases intracellular cAMP production affecting directly (via the cyclic nucleotide binding domain, CNBD, of HCN channels) or indirectly via protein Kinase A (PKA) the activity of voltage-gated ion channels involved in cardiac pacing, mainly HCN4 (underlying the I_f current) and L-type Ca^{2+} channels ($I_{Ca,L}$). Two isoforms of L-type Ca^{2+} channels are expressed in pacemaker cells of the sinus node: $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$. However, only $Ca_v1.3$ channels are open at low diastolic voltages, thus providing an inward current during diastolic depolarization. L-type $Ca_v1.3$ channels are therefore a potentially important effector of cholinergic regulation of cardiac pacemaker activity.

I have employed the patch-clamp technique, isolated Langendorff-perfused hearts and in vivo telemetric recordings of electrocardiogram to study the role of $Ca_v1.3$ and I_{KACh} in cholinergic regulation of pacemaker activity. I found that concomitant ablation of I_{CaL} carried by $Ca_v1.3$ and I_{KACh} carried by GIRK1/4 prevents cholinergic regulation after β-adrenergic stimulation. These data show strong functional interaction between $Ca_v1.3$ and GIRK1/4 in cholinergic regulation of pacemaking. In addition, we show that $Ca_v1.3$ and $Ca_v1.2$ are both sensitive to acetylcholine, however $Ca_v1.3$ display sensitivity to low doses while $Ca_v1.2$ to high doses.

In conclusion, L-type $Ca_v1.3$ channels play an important role in cholinergic regulation of pacemaking together with GIRK1/4 underlying I_{KACh}.

Key words: Sino-atrial node, pacemaker, cardiac automatism, calcium channels, parasympathetic nervous system regulation, cholinergic regulation

Valorisation des travaux de recherches

Publications

- Etude principale :

  Talssi L, Bidaud I, Torre E, Mangoni ME, Mesirca P. *Concomitant ablation of L-type $Ca_v1.3$ (alpha$_{1D}$) calcium and G protein gated inward rectifying Girk4 channels in mice disrupts muscarinic regulation of pacemaker activity.* (En cours de rédaction)

- En collaboration :

  Baudot M, Torre E, Bidaud I, Louradour J, Torrente AG, Fossier L, **Talssi L**, Nargeot J, Barrère-Lemaire S, Mesirca P, Mangoni ME. *Concomitant genetic ablation of L-type $Ca_v1.3$ (alpha$_{1D}$) and T-type $Ca_v3.1$ (alpha$_{1G}$) calcium channels disrupt heart automaticity.* Sci Rep. 2020 Nov 3;10(1):18906

Présentations lors de colloque ou congrès

Functional role of $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in muscarinic regulation of heart rate

- Patch-club – 2019 – Montpellier : **Présentation orale**

Functional role for the GIRK1/4, $Ca_v1.3$ and HCN4 channels in muscarinic regulation of heart rate

- Société française de Physiologie – 2019 – Montpellier : **Présentation Poster**

- 30th Ion Channel Meeting – 2019 – Sète : **Présentation Poster**

Cholinergic regulation of cardiac pacemaker activity by L-Type $Ca_v^{1.3}$ channels

- Congrès de l'ESC (European Society of Cardiology) – 2020 (Digital) : **Présentation Poster**

Cholinergic regulation of heart rate: functional importance of l-type Ca_v1.3 channels

- Printemps de la Cardiologie – 2020 (Digital) : **Présentation Poster**

Cholinergic regulation of cardiac pacemaker activity by L-Type Ca_v1.3 channels

- Congrès de l'EHRA (European Heart Rythm Association) - Session EWGCCE (European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology) – 2021 (Digital) : **Présentation orale**

Formations dans le cadre du doctorat

- Ecole d'électrophysiologie de Montpellier – 25 heures
- Formation spécifique destinée aux personnes concevant ou réalisant les procédures expérimentales – 25 heures
- MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche – 15 heures
- MOOC Ethique de la recherche – 15 heures
- Optimiser ses interventions avec supports visuels – 14 heures
- Cérémonie solennelle 2019 de rentrée des doctorants du Collège Doctoral de l'Université de Montpellier – 6 heures

Liste des abréviations

ACh : Acétylcholine

AKAP : A-Kinase Anchoring Protein - protéine d'ancrage à la PKA

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

BPM : Battement Par Minute

BSA : Bovine Serum Albumine – Albumine de sérum bovin

CCPA : 2-Chloro-N^6-cyclopentyladenosine

CDF : Calcium-Dependent Facilitation - facilitation calcium dépendante

CDI : Calcium-Dependent Inactivation - inactivation calcium dépendante

CNBD : Cyclic Nucleotide Binding Domain – Domaine de liaison des nucléotides cycliques

cNOS : NOS constitutive

CT : Crista Terminalis

Cx : Connexine

DHP : Dihydropyridine

ECG : Electrocardiogramme

EOPS : Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique

FNA : Facteur Natriurétique Auriculaire

GIRK : G-protein regulated inward-rectifier potassium channel – canal potassique à rectification entrante régulé par la protéine G

GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique

HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated

HR : Heart Rate – rythme cardiaque

IP : Intra-péritonéal

ISO : Isoprénaline (ou isoprotérénol)

KO : Knock-Out

LTCC : L-Type Calcium Channel - Canal calcique de type L

NAV : Nœud Atrio-Ventriculaire

NCX : Echangeur Sodium Calcium

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NSA : Nœud Sino-Atrial

PA : Potentiel d'Action

PDE : Phosphodiestérase

PKA : Protéine Kinase A

RyR : Ryanodine Receptor - Récepteur à la Ryanodine

SNA : Système Nerveux Autonome

SNP : Système Nerveux Parasympathique

SNS : Système Nerveux Sympathique

SOPF : Specific and Opportunistic Pathogen Free – Exempt de pathogène spécifique et opportuniste

TTCC : T-Type Calcium Channel – Canal calcique de type T

TTX : Tétrodotoxine

VDKC : Voltage dependant potassium channel - canaux potassiques voltage dépendants

VGCC : Voltage Gated Calcium Channel – Canal calcique avec ouverture dépendante du voltage

VGSC : Voltage Gated Sodium Channel – Canal sodique avec ouverture dépendante du voltage

WT : Wild Type – Type Sauvage

Table des matières

Préface - 2 -
Remerciements - 3 -
Résumé - 4 -
Abstract - 5 -
Valorisation des travaux de recherches - 6 -
Publications - 6 -
Présentations lors de colloque ou congrès - 6 -
Formations dans le cadre du doctorat - 8 -
Liste des abréviations - 9 -
Introduction - 15 -
I - Généralité - 16 -
Structure du cœur - 16 -
Anatomie - 16 -
Histologie des tissus cardiaques - 18 -
Propriété du cœur - 19 -
La fonction de pompe - 19 -
Les cycles de contractions et la circulation sanguine - 19 -
La relation fréquence/force - 22 -
Biologie cellulaire cardiaque - 22 -
L'appareil contractile des cellules musculaires striées cardiaques - 24 -
Le couplage excitation-contraction - 24 -
II - Le Pacemaker - 27 -
Le tissu conducteur - 27 -
Le NSA et le NAV - 27 -
Les fibres de Purkinje - 27 -
Hiérarchisation du tissu conducteur - 28 -
Le nœud sino atrial et de son environnement - 29 -
La cellule pacemaker - 29 -
Environnement et structure - 31 -
La conduction du signal : les jonctions communicantes - 35 -
Le site d'initiation de l'activité pacemaker - 37 -
Les canaux ioniques dans l'activité pacemaker - 38 -

Les canaux activés par l'hyperpolarisation f-(HCN) - 38 -
Les canaux calciques - 42 -
Les canaux potassiques - 49 -
Les canaux sodiques Nav1.1 et Nav1.5 - 52 -
Le cas particulier du courant I_{st} - 53 -
La dynamique calcique intracellulaire de la cellule pacemaker - 54 -
L'échangeur NCX dans l'automatisme cardiaque - 54 -
Le mécanisme pacemaker : Les concepts qui divisent - 56 -
Le « membrane clock » - 56 -
Le « Calcium clock » - 56 -
Le modèle de l'horloge couplée (*coupled clock*) pour expliquer l'automatisme - 57 -
Interaction fonctionnelle entre les canaux $Ca_v1.3$ et les récepteurs RyR2 - 58 -
L'émergence de nouveaux concepts sur le rôle des canaux calciques dans l'automatisme - 59 -
Le potentiel d'action de la cellule pacemaker - 59 -
Les voies de régulation de la fréquence cardiaque - 62 -
La voie de régulation sympathique - 64 -
La voie de régulation parasympathique - 65 -
Objectifs - 67 -
L'acteur historique : GIRK1/4 - 68 -
L'acteur découvert : HCN4 - 69 -
Un nouvel acteur potentiel à découvrir : $Ca_v1.3$ - 70 -
Matériels et Méthodes - 73 -
Les animaux - 74 -
Les souris Wild Type - 74 -
Les souris HCN4-CNBD - 74 -
Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ - 75 -
Les souris $GIRK4^{-/-}$ - 76 -
Les doubles mutants HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ - 77 -
Méthode d'anesthésie - 78 -
Prélèvement du cœur - 78 -
Méthode de cœur isolé perfusé ou Langendorff - 79 -
Montage du cœur sur le système - 79 -
Solutions perfusées - 80 -
Protocole de perfusion des solutions - 81 -
Analyse - 81 -

Cartographie optique - 82 -
Préparation du tissu - 82 -
Traitement du tissu sinusal pour l'acquisition - 83 -
Acquisition - 83 -
Solutions utilisées - 83 -
Analyses - 84 -
Microscopie Confocale - 85 -
Obtention des cellules du sinus atrio-ventriculaire isolées - 85 -
Préparation des cellules - 86 -
Acquisition - 87 -
Solutions utilisées - 87 -
Analyse - 88 -
Patch Clamp - 89 -
Isolation des cellules - 89 -
Préparation des cellules - 89 -
Acquisition - 89 -
Analyses - 92 -
Enregistrement *in vivo* d'ECG - Télémétrie - 92 -
Anesthésie et préparation de la souris - 92 -
Protocole chirurgical - 93 -
Suivi post-intervention - 94 -
Enregistrement d'ECG - 94 -
Solutions injectées - 95 -
Analyses - 95 -
Résultats - 96 -
Les acteurs de la régulation adrénergique - 97 -
Etude de la fréquence cardiaque *in vivo* en présence d'agoniste du système nerveux parasympathique - 99 -
Etude de la fréquence cardiaque *ex vivo* en condition d'antagonisme accentué - 107 -
Etude de la fréquence de dépolarisation du tissu sinusal lors d'une régulation par le système nerveux parasympathique - 110 -
Etude de l'automatisme cardiaque par analyse des potentiels d'action des cellules pacemaker - 115 -

Etude de la dynamique calcique intracellulaire en condition d'antagonisme accentué - 118 -
La réponse du courant diastolique à la régulation cholinergique - 124 -
Le courant calcique de type L et la régulation cholinergique - 127 -
Résultats supplémentaires - 131 -
Etude de la fréquence cardiaque *in vivo* - 131 -
Effet d'une stimulation adrénergique sur ECG *ex vivo* - 132 -
Effet d'une stimulation adrénergique sur la fréquence des potentiels d'action. - 134 -
Effet d'une stimulation adrénergique sur le courant calcique de type L - 136 -
Discussion - 138 -
L'étude des voies cholinergique et adénosinergique *in vivo* - 139 -
En condition *ex vivo*, l'ablation concomitante de $Ca_v1.3$ et GIRK4 bloque la régulation cholinergique après une stimulation β-adrénergique sur cœur entier - 141 -
Le site d'initiation de l'automatisme cardiaque dans le NSA se déplace grâce à I_{KACh} - 141 -
Les dysfonctions sinusales dues à l'ablation de $Ca_v1.3$ peuvent être sauvées par l'ablation concomitante de GIRK1/4 - 142 -
La libération locale de calcium par le réticulum sarcoplasmique n'est pas corrélée ou couplée à l'automatisme au cours de la régulation cholinergique en antagonisme accentué - 143 -
Le courant diastolique est impacté par l'ablation de GIRK4 et $Ca_v1.3$ - 144 -
Les deux composantes de I_{CaL} et leur différence de sensibilité à l'Acétylcholine jouent un rôle dans la régulation cholinergique - 144 -
Conclusion et perspectives - 146 -
Annexes - 149 -
Tables des figures - 150 -
Publication associée à mon nom - 158 -
Bibliographie - 177 -

Introduction

I - Généralité

Structure du cœur

Anatomie

Le cœur est un organe et un muscle ayant pour fonction le pompage du sang dans le système circulatoire sanguin afin d'apporter à chaque cellule de l'organisme ses besoins en oxygène et nutriments.

Chez les mammifères, le cœur se divise en deux parties : droite et gauche, séparées par un septum. Chacune de ces divisions est constituée d'une oreillette et d'un ventricule, également séparées par une valve tricuspide du côté droit, et mitrale du côté gauche. De ce fait, les deux ventricules et les deux oreillettes se retrouvent cloisonnés et vont chacun avoir un rôle différent dans la circulation sanguine qui sera vu ultérieurement (Figure 1).

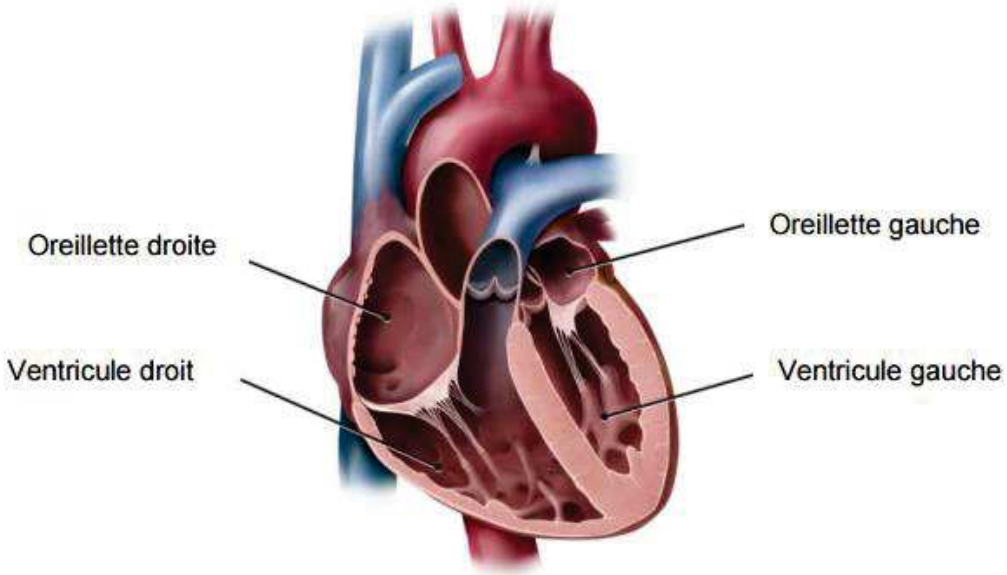


Figure 1 : Schéma d'une coupe frontale du cœur humain et représentation des oreillettes et des ventricules

Le cœur possède également un tissu cardionecteur qui parcours toute la longueur de sa structure, il va ainsi permettre de conduire le signal électrique à la totalité de l'organe (Figure 2). Il est composé :

- Le nœud sino-atrial (ou nœud de Keith et Flack) (NSA)
- Le nœud atrio-ventriculaire (ou nœud auriculo-ventriculaire d'Aschoff et Tawara) (NAV),
- Les faisceaux de His
- Le réseau des fibres de Purkinje

De plus, bien que les faisceaux de His et le réseau des fibres de Purkinje conduisent le signal sur le cœur gauche et le cœur droit, il existe une certaine asymétrie. En effet chez la souris, un modèle animal communément utilisé pour l'approche scientifique de la collecte de données sur la physiologie des mammifères, il a été mis en évidence que les ventricules droit et gauche ne bénéficiaient pas de la même couverture de ce réseau. En effet le cœur droit est constitué de branche moins fournit en brin du faisceau de His que le cœur gauche et le même constat a été fait concernant la densité des fibres de Purkinje. Ces différences de constitutions du réseau His-Purkinje vont alors amener à des schémas d'activation différents sur le cœur droit et gauche et mettent en lumière des rôles différents de ces compartiments cardiaques (Miquerol et al. 2004).

.

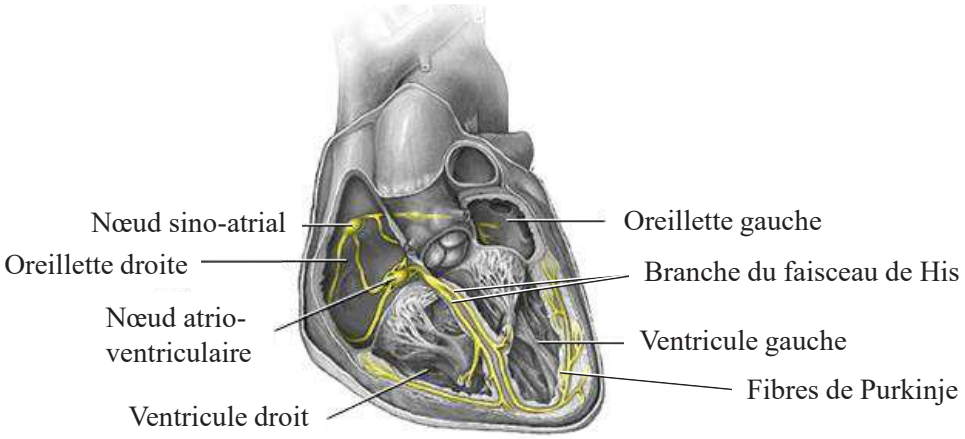


Figure 2: Schéma d'une coupe frontale de cœur et tissu conducteur (en jaune) cardiaque.

Histologie des tissus cardiaques

Dans la cage thoracique, le cœur est enveloppé du péricarde, qui va permettre de le protéger tout en permettant le mouvement lors des contractions. Il est enclavé par le sternum et les poumons. Sa structure est organisée en trois feuillets : l'épicarde, le myocarde et l'endocarde :

L'épicarde est le feuillet externe du cœur, en contact avec le feuillet viscéral du péricarde séreux. Il est principalement constitué de tissu épithélial et conjonctif.

Le myocarde est le principal feuillet musculaire du cœur, il assure la fonction de pompe, et se présente plus ou moins épais au niveau des cavités cardiaques en fonction de la pression exercée sur ces zones. En effet le cœur droit et le cœur gauche ont des rôles différents dans la circulation sanguine (qui sera évoquée ultérieurement), le myocarde sera plus épais notamment dans le ventricule gauche qui va permettre d'éjecter le sang dans la circulation systémique. Il sera plus fin dans le ventricule droit qui éjecte le sang dans la circulation pulmonaire.

L'endocarde est le feuillet interne, en contact direct avec les cavités internes. Il est principalement constitué d'un endothélium.

Chacun de ces feuillets est innervé et irrigué par la circulation sanguine afin de maintenir toute la fonctionnalité cardiaque (Figure 3).

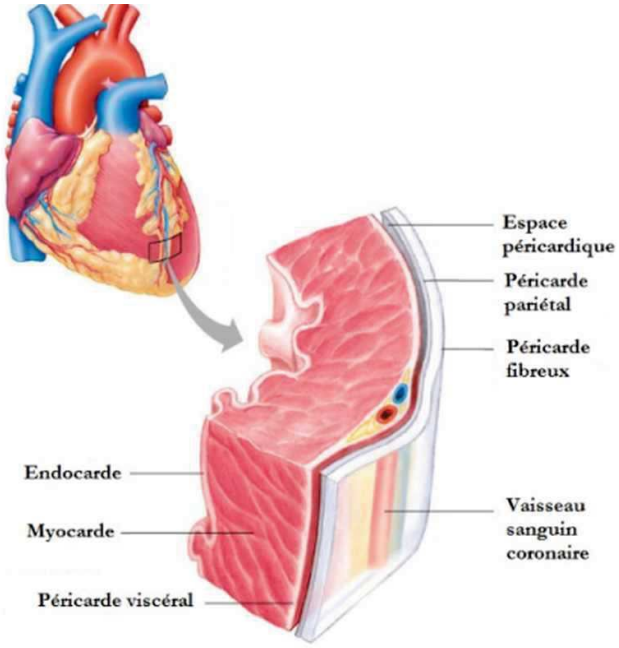


Figure 3: Details des trois feuillets cardiaques et des espaces inter-feuillets

Propriété du cœur

La fonction de pompe

La fonction de pompe du cœur est permise notamment par un nombre important de cellules musculaires dans cet organe et par des jonctions intercellulaires qui permettent une organisation sous forme de syncytium fonctionnel.

Les cycles de contractions et la circulation sanguine

Le cœur permet la circulation du sang dans tout l'organisme, il est donc en charge d'apporter à chaque cellule ses besoins en oxygène et en nutriments. C'est la circulation artérielle. Mais le cœur est également responsable du cheminement de certains déchets de l'organisme tel que le dioxyde de carbone qui sera par exemple évacué dans les poumons par échanges gazeux, c'est la circulation veineuse.

Mais la circulation sanguine peut également être caractérisée d'une autre manière, en effet le côté droit du cœur est en fait responsable de la circulation pulmonaire et le côté gauche, de la circulation systémique.

Le sang oxygéné et riche en nutriment dans l'oreillette gauche va commencer à s'écouler dans le ventricule gauche grâce à l'ouverture de la valve mitrale, c'est la phase de diastole ventriculaire, qui correspond à la phase de relâchement et de remplissage. La systole auriculaire, qui intervient avant la fin de la diastole ventriculaire va permettre la fin de cet écoulement afin que le ventricule gauche atteigne le volume télédiastolique (volume de sang dans le ventricule gauche juste avant l'éjection). Débute alors la systole ventriculaire, après une contraction isovolumétrique, le ventricule gauche va alors propulser le sang dans la crosse aortique par la valve aortique. La totalité de l'organisme va alors recevoir le sang riche en nutriments et oxygène par toute la circulation artérielle jusqu'à atteindre les artérioles.

Au niveau cellulaire, les artérioles vont déboucher par des sphincters pré-capillaires : ils seront ouverts pour favoriser les échanges gazeux, ou fermer en fonction du besoin des cellules. Ces échanges se dérouleront dans une veinule post-capillaire.
Le retour veineux jusqu'à l'oreillette droite se fera majoritairement grâce à des valvules dites anti-reflux le long des veines et par des cellules musculaires lisses qui peuvent se contracter sous l'ordre du Système Nerveux Central (SNA).

Les veines supérieures et inférieures vont alors se déverser dans l'oreillette droite, la diastole suivie de la systole auriculaire va alors permettre le remplissage du ventricule droit en passant par la valve tricuspide. La systole ventriculaire va éjecter le sang dans l'artère pulmonaire en passant par la valve pulmonaire pour permettre au sang de s'enrichir en oxygène et va ensuite repasser dans l'oreillette gauche par quatre veines pulmonaires (Figure 4).

Un cycle cardiaque correspond donc à l'enchainement d'une phase de diastole et de systole, rendu possible grâce au lusitropisme du muscle cardiaque qui correspond à la capacité d'un muscle à se relâcher et se décontracter après une contraction.

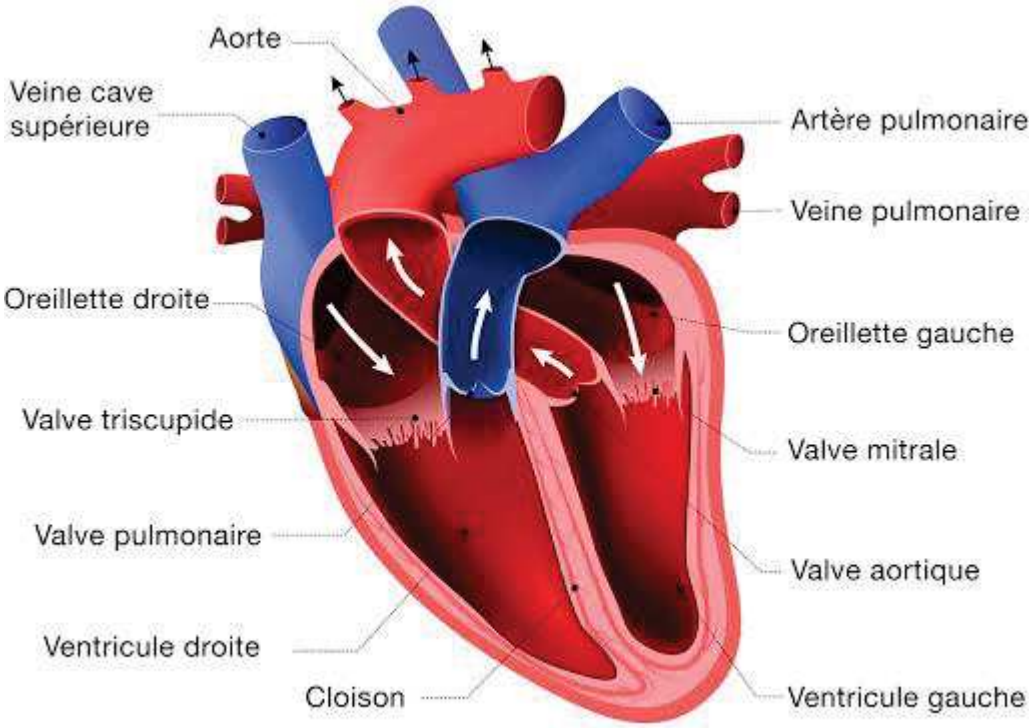


Figure 4: La circulation sanguine dans le cœur

Le cœur est lui-même irrigué par le système coronarien artériel qui prend naissance au niveau du sinus de Valsalva pour irriguer le muscle longitudinalement (Figure 5) pour finir par le système coronarien veineux qui débouche dans le sinus coronaire (Figure 6).

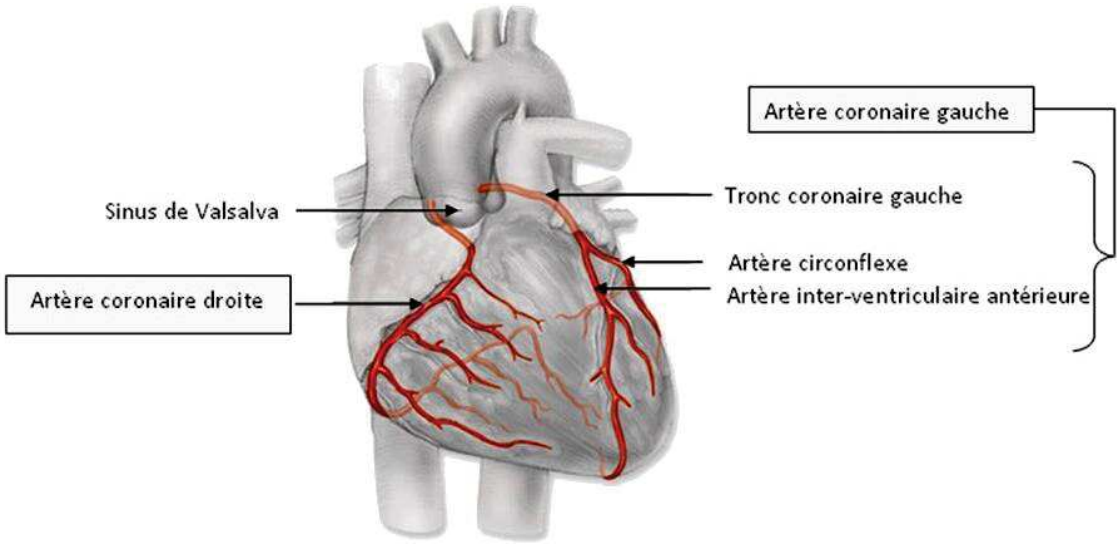


Figure 5: Le système coronarien artérielle

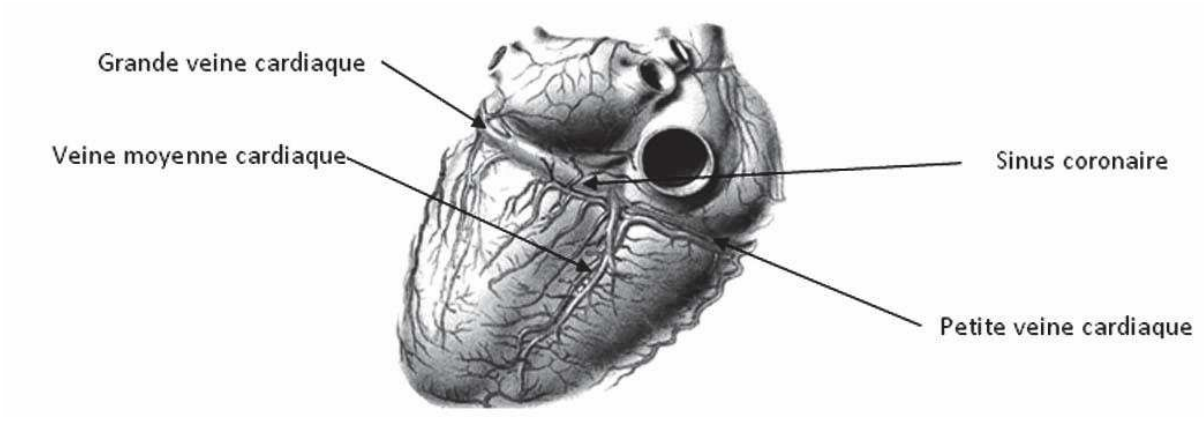


Figure 6: Le système coronarien veineux

La relation fréquence/force

Malgré cette grande coordination, le cœur doit encore mettre en œuvre certaines stratégies afin de garder un certain équilibre en fonction des différentes conditions physiologiques qui peuvent se présenter dans l'organisme.

Afin de garder cet équilibre, différents paramètres vont pouvoir être modulés afin d'assurer un débit cardiaque (volume de sang expulsé par chaque ventricule du cœur par unité de temps) suffisant pour l'organisme à la sortie du ventricule gauche. En effet le volume d'éjection systolique (volume de sang éjecté par chaque ventricule à chaque cycle cardiaque) modulé par l'inotropisme (capacité du myocarde à se contracter), le chronotropisme (capacité du cœur à réguler sa fréquence cardiaque) et les résistances artérielles systémiques vont être les éléments permettant de moduler le débit cardiaque afin d'atteindre une pression artérielle (force exercée par le sang sur les parois des artères) conforme aux besoins de l'organisme.

De plus le cœur va également devoir s'adapter à la précharge, c'est-à-dire l'entrée du sang dans les ventricules avant contraction, qui peut ne pas être toujours à l'identique en fonction de différents phénomènes physiologiques dans l'organisme vivant, comme par exemple un exercice physique ou une pathologie telle que l'insuffisance cardiaque. Pour cela, le cœur va alors suivre la loi de Starling (ou Franck-Starling).

Cette loi stipule que l'étirement des fibres myocardiques causé par une augmentation du volume télédiastolique entraine une augmentation de la force de contraction de ces fibres et aura pour conséquence une augmentation du volume d'éjection systolique.

Biologie cellulaire cardiaque

Les cardiomyocytes constituent en réalité trois types de cellules aux rôles distincts : les cardiomyocytes contractiles, les cellules myoendocrines et les cellules cardionectrices ou « pacemaker ».

Les cardiomyocytes se trouvent majoritairement dans le myocarde et permettent la bonne contraction des oreillettes mais ils sont majoritairement présents dans les ventricules, ces derniers ayant un travail d'éjection systoliques plus important que les oreillettes. Ces cellules diffèrent des cellules musculaires striées squelettiques par différents aspects : elles sont plus courtes, ne présentent qu'un seul noyau et peuvent avoir des extrémités en bifurcation ou non, qui les aident à se connecter entres elles. Elles possèdent cependant, tout comme les cellules des muscles squelettiques, un appareil contractile important.

Les cellules myoendocrines possèdent peu de myofibrilles mais une activité endocrine importante, en effet ces cellules possèdent de nombreuses vésicules de sécrétion contenant le facteur natriurétique auriculaire (FNA) qui va permettre, en cas d'augmentation de volume ou de pression dans les cavités cardiaque, l'adaptation de la volémie par une action sur les tubules rénaux (Haloui et al. 2000). En effet le FNA va être sécrété à la suite d'une augmentation de la volémie, qui va engendrer une distension des myocytes auriculaires. Ce FNA va alors avoir une action sur les néphrons, afin d'augmenter l'élimination du sodium (Na^+) pour ainsi faire baisser la volémie.

Enfin les cellules cardionectrices sont des cellules présentant, comme les cellules myoendocrines, peu de myofibrilles mais qui sont surtout des cellules auto-excitables capables de générer une activité électrique spontanée sous forme de potentiel d'action (PA).

La jonction entre ces cellules est primordiale, en effet l'activité contractile du cœur dépend de la bonne propagation du signal électrique. Pour cela les cardiomyocytes sont connectés entre eux grâce à des disques intercalaires comprenant :

-des desmosomes qui permettent une forte adhésion des cellules, ce qui empêche les cellules de se détacher les unes des autres par les contractions répétées

-des zonula adhaerens qui servent également de point d'ancrage mais aussi connectent les dernières zones des appareils contractiles de chaque cardiomyocyte voisin

-des jonctions communicantes permettant le transfert de courant électrique et de deuxièmes messagers d'une cellule à l'autre.

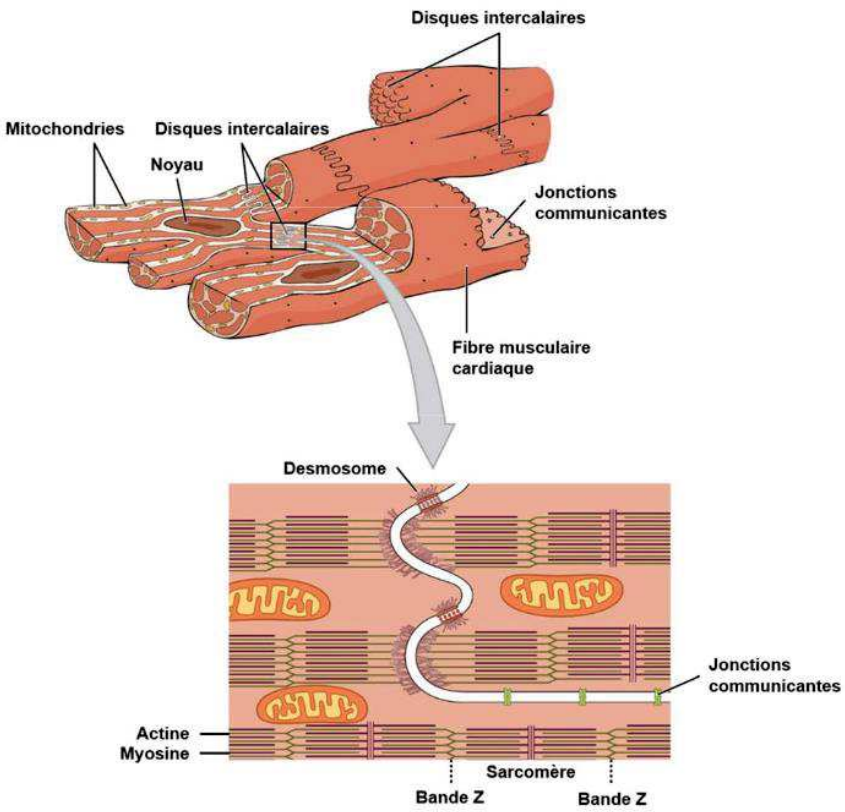


Figure 7: Les jonctions inter-cardiomyocytes

L'appareil contractile des cellules musculaires striées cardiaques

Ces cellules sont donc riches en myofibrille, elles même possédant des sarcomère, unité de base de la myofibrille. Ces sarcomères sont constitués de filaments épais de myosine de type 2, de filaments fins d'actine, et de la titine, une protéine liée aux filaments de myosines.

La demande énergétique importante de ces cellules nécessite un nombre important de mitochondries présentes entre les myofibrilles et un système de vascularisation efficient qui est contenu dans l'endomysium, un tissu conjonctif entourant les fibres musculaires.

Le couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est le phénomène qui permet le déclenchement de la contraction d'une cellule musculaire par l'arrivée d'un signal électrique à sa membrane.

Lorsque le signal électrique, le potentiel d'action, va arriver jusqu'au sarcolemme, et notamment à ses invaginations appelées tubules T, cela déclenche l'ouverture des canaux calciques de type L voltage-dépendants permettant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Cette augmentation du Ca^{2+} intracellulaire va alors induire l'ouverture des Récepteurs à la Ryanodine (RyR) situés sur la surface du Réticulum Sarcoplasmique (RS) entrainant ainsi une augmentation massive du Ca^{2+} intracellulaire. Ce phénomène est connu sous le nom de Calcium Induced Calcium Released (CICR). Parmi les trois isoformes des RyR connues, RyR 2 est celle qui est majoritairement exprimée dans le cœur.

Cette hausse de Ca^{2+} va alors permettre de lever la fonction inhibitrice de la Troponine-C, une protéine régulatrice de l'activité du sarcomère : en effet cette fixation va permettre un changement de conformation de la protéine, qui va activer l'adénosine triphosphatase (ATPase) située sur les têtes de myosine (Figure 8). Cette activation va apporter suffisamment d'énergie pour de démasquer les sites de liaison actine-myosine et afin de déclencher la contraction.

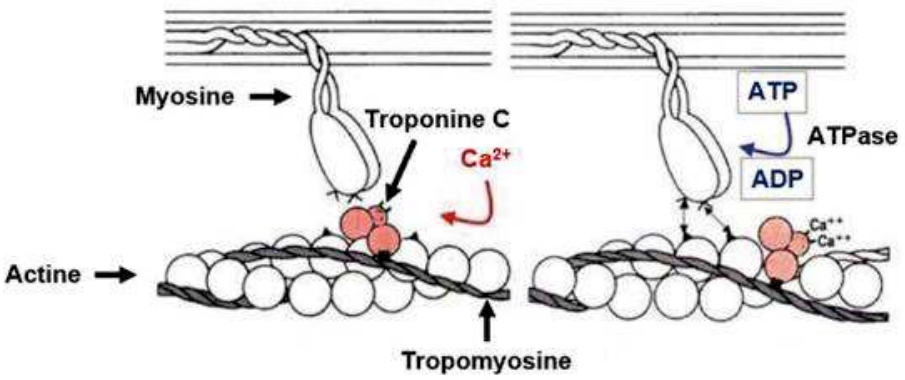


Figure 8: La régulation de la contraction par le couple Troponine-Tropomyosine

A la fin de ce cycle de contraction, le Ca^{2+} intracellulaire (délétère pour la cellule à trop forte concentration) est évacué du sarcoplasme par deux processus différents : tout d'abord la captation par la pompe SERCA2 pour un re-remplissage du RS mais également par extrusion du cytosol par l'échangeur Na^{+}/ Ca^{2+} (NCX). Dans ce mécanisme de contraction, le Ca^{2+} est le second messager indispensable au bon fonctionnement de la contraction cardiaque (Figure 9).
Dans les cardiomyocytes, il existe un mécanisme de sécurité afin d'empêcher deux activités électriques sous forme de PA dans la même cellule et de façon trop rapprochées. Dans le cœur,

ce mécanisme est fondamental pour prévenir les phénomènes arythmogènes. C'est ce qu'on appelle la période réfractaire. Elle sera absolue, étape pendant laquelle aucune stimulation électrique ne sera propagée d'une cellule à une autre. Puis elle devient relative, et plus on est proche de la période réfractaire absolue, plus la stimulation devra être forte pour déclencher un nouveau PA.

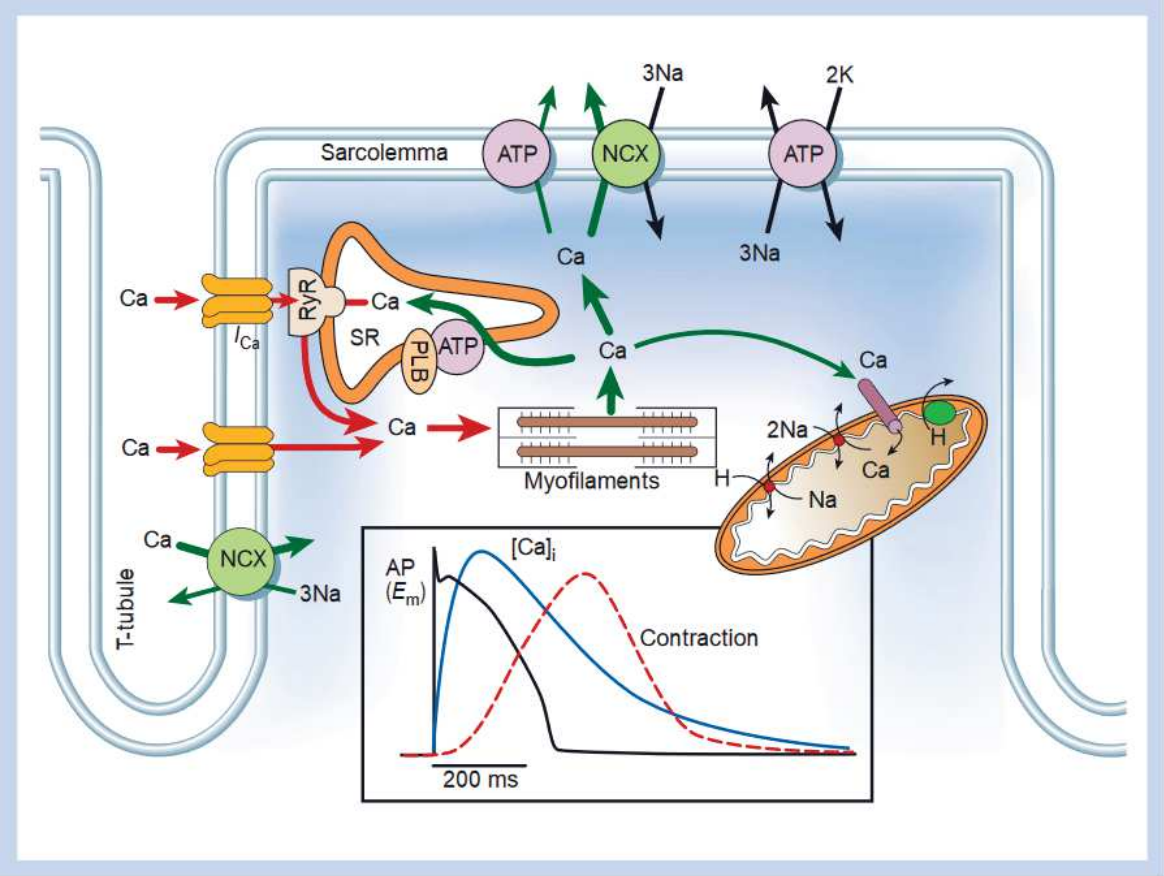


Figure 9: Représentation du Calcium Induced Calcium Released dans un myocyte et visualisation sur la même échelle de temps d'un potentiel d'action, de la concentration de Ca^{2+} dans la cellule et de la contraction. D'après Bers, 2002.

II - Le Pacemaker

Le tissu conducteur

Le NSA et le NAV

Le NSA est le chef d'orchestre du rythme cardiaque. Il se situe dans la région inter cavale, au niveau de la veine cave supérieure dans l'oreillette droite, il est bordé par la crista terminalis (CT), une bande épaisse de cellules atriale (Boyett et al. 2000), l'anneau fibreux sinoatrial et le septum inter atrial.

Il est constitué de cellules cardionectrices appelées aussi « pacemakers ».

Les cellules du NSA sont donc capables de générer une activité électrique spontanée sous forme de potentiel d'action à une fréquence intrinsèque de 120 PA/minutes chez l'Homme. Mais de par leurs grandes spécificités, leurs potentiels d'action leurs sont propres et clairement différentiables des autres PA qui peuvent être générer dans le cœur. Les particularités de ces PA seront ainsi abordées dans une section ultérieure.

Le NAV est le point de contact du tissu conducteur entre les oreillettes et les ventricules. Tout comme le NSA, il est capable de générer une activité électrique spontanée intrinsèque de 70 PA/minutes. Il est relié au NSA par trois faisceaux inter nodaux et sera le point de départ du faisceau de His. Ce faisceau va lui-même se subdiviser en deux branches qui longent le septum interventriculaire pour atteindre l'apex et finir par se ramifier. Il laisse alors place aux cellules de Purkinje comme derniers acteurs de la conduction électrique.

Les fibres de Purkinje

Les fibres de Purkinje conduisent le signal de dépolarisation aux membranes des cellules sur l'ensemble des parois du cœur afin d'engager la contraction synchrone des ventricules.

Cette localisation va permettre à la contraction ventriculaire d'être la plus efficace possible afin de diriger le sang vers l'artère pulmonaire ou l'aorte.

Hiérarchisation du tissu conducteur

Ce système de génération et de conduction de signal électrique dans le cœur est hiérarchisé en fonction de la fréquence des PA/minutes de ces centres rythmogènes : en effet le NSA a une fréquence de dépolarisation plus élevée que celle du NAV, celle du NAV est plus élevée que dans le faisceau de His et des fibres de Purkinje. C'est pour cela que le NSA est le centre rythmogène dominant dans des conditions physiologiques.

Chaque acteur de ce système de conduction va lui-même générer des PA différents ainsi que dans les zones où ils permettent la conduction du signal électrique (Figure 10).
. Ici seront évoqués les PA des myocytes atriaux, ventriculaires, et des fibres du réseau des fibres de Purkinje (Nerbonne and Kass, 2005). Les PA du NSA seront étudié plus en détails ultérieurement.

Les potentiels d'action peuvent être analysés en fonction de cinq phases :

- La phase 0 qui est l'étape de dépolarisation rapide engendré par l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendant. Cette dépolarisation aura aussi comme effet d'activer des courant calciques de type L.
- La phase 1 est une phase transitoire de repolarisation qui commence à l'inactivation des canaux sodique responsable de la phase 0 et à l'activation d'un courant potassique sortant ($I_{to,f}$)
- La phase 2 dite de plateau qui est porté par un courant potassique et par le courant calcique encore présent permettra le couplage excitation contraction durant cette phase.
- La phase 3, de repolarisation, est soutenue par un fort courant potassique lorsque que le courant calcique s'inactive.
- La phase 4 permet à la cellule de retrouver son potentiel de repos à la membrane.

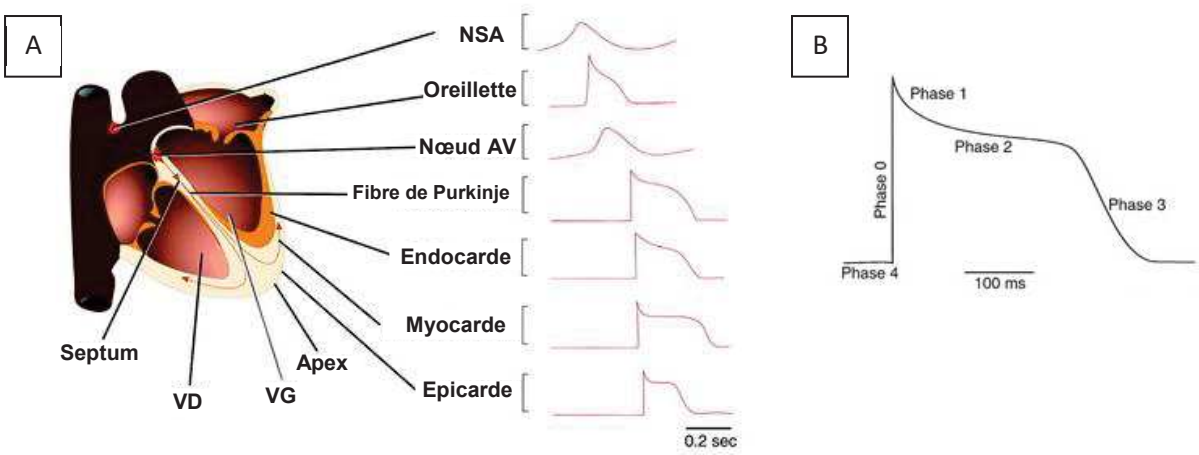


Figure 10: A : Propagation du potentiel d'action sinusal dans le cœur et représentation des différents potentiels d'action dans le tissu conducteur. Adapté de Nerbonne et Kass, 2005. B : PA ventriculaire et les différentes phases qui le compose.

Le nœud sino atrial et de son environnement

Le nœud sino atrial ou NSA forme une structure particulière qui permet non seulement la génération de l'activité électrique responsable des battements cardiaques, mais également de la bonne transmission de ce signal aux oreillettes.

La cellule pacemaker

Les cellules du NSA ont été isolées et décrites dans plusieurs mammifères tel que le lapin (DiFrancesco et al. 1986), le cochon d'inde (Anumonwo et al. 1992), le cochon (Ono et al. 2000), le rat (Shinagawa et al. 2000) et la souris (Mangoni et al. 2001) et dont les caractéristiques morphologiques se retrouvaient dans ces espèces. Il s'est avéré que trois formes différentes de cellules se distinguaient : les « Spindle », les « Elongated » et les « Spider » tout d'abord dans le lapin (Figure 11A) (DiFrancesco et al. 1986; Verheijck E. Etienne et al. 1998) puis dans la souris (Figure 11 B) (Mangoni and Nargeot, 2001).

Les cellules spindle sont souvent plus petites que les cellules elongated et spider chez la souris et le lapin. Elles ont également une capacitance plus faible (entre 15 et 30 pF) que les cellules elongated (entre 35 et 50 pF). Chez le lapin, la morphologie spindle est considérée comme celle qui représente les cellules "principale" alors que l'on considère les cellules allongées comme

plus éloignées du centre du NSA (Honjo et al. 1996) et plus abondantes dans les zones adjacentes à la CT que les spindle et les spider (Verheijck E. Etienne et al. 1998).

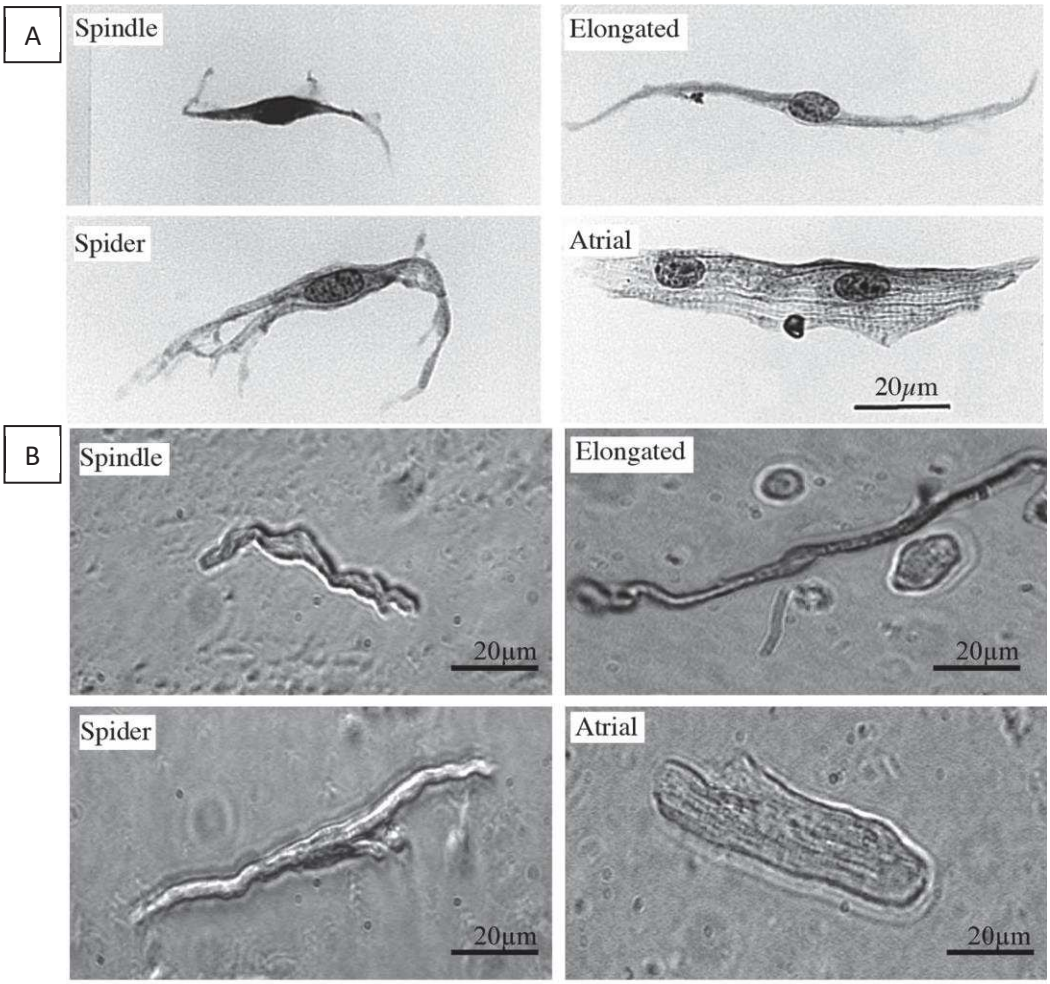


Figure 11: Les différentes morphologies des cellules pacemakers ; A : Chez le lapin. D'après Verheijck et al. 1998. B : chez la souris. D'après Mangoni et Nargeot, 2008. Une cellule atriale est présente pour la comparaison.

Cependant, l'intérêt fonctionnel de ces différentes morphologiques n'est toujours pas confirmé à ce jour (Mangoni and Nargeot, 2008).

Environnement et structure

Chez l'Homme, le NSA est inséré dans un feuillet de cellules atriales qui pourrait avoir un rôle protecteur (Rh et al. 1981). Cependant des projections du NSA ont été observés dans la CT, dans le sillon terminal de l'épicarde, les muscles pectinés auriculaires et au niveau du septum inter-auriculaire (Stephenson et al. 2017).

Il existe deux théories structurales concernant la constitution du NSA concernant les cellules pacemakers.
Les travaux de Verheijck en 1998 nous fait part d'un modèle mosaïque : le NSA intact présenterai une augmentation graduelle de densité de cellules atriales en son sein, au fur et à mesure que l'on s'approche de la CT et des oreillettes. Cela permettrait d'expliquer que les potentiels d'action transitionneraient petit à petit d'un schéma nodal vers un schéma atrial, grâce à l'influence des oreillettes sans que les différences morphologiques des cellules pacemaker soient impliquées (Verheijck E. Etienne et al. 1998).
Mais l'équipe de Boyett nous présente un modèle basé sur le gradient en se basant sur plusieurs points. Tout d'abord leur technique d'isolation de cellule pacemaker ne leur permettent pas d'observer un nombre assez conséquent de cellules atriales pour valider la théorie de la mosaïque. De plus, d'après leurs observations, les différences morphologiques des cellules pacemaker, comme par exemple leurs différences de conductances, ainsi que leur emplacement dans le NSA pourraient expliquer la transition de PA nodaux vers des PA atriaux (Mr et al. 2000).

Des reconstitutions en 3 dimensions du cœur humain a permis non seulement de déterminer la taille du nœud sinusal, mais également de mettre en lumière une zone appelé « zone paranodale » autour du nœud sinusal (Figure 12 et 13) (Chandler et al. 2011; Dobrzynski H. et al. 2005; Stephenson et al. 2017).

Chez l'Homme, le NSA est une structure complexe, spécialisée et hétérogène contenant plusieurs centre pacemaker intra-nodaux ainsi que des voies de conduction sino-atriales spécialisées. Des études *ex vivo* sur des cœurs humains souffrant de dysfonction du nœud sinusal pouvaient présenter des remodelages de ces voies de conduction sino-atriales spécialisées, de modification d'expression de canaux ioniques spécifiques à l'automatisme

cardiaque, ou bien encore de modifier l'expression de certains récepteurs à la régulation par le système nerveux autonome de cette activité pacemaker. Les différentes zones spécialisées dans le NSA humain permettent alors de préserver cette automatisme cardiaque en cas notamment de dysfonction due à l'âge ou la maladie (Mesirca et al. 2021).

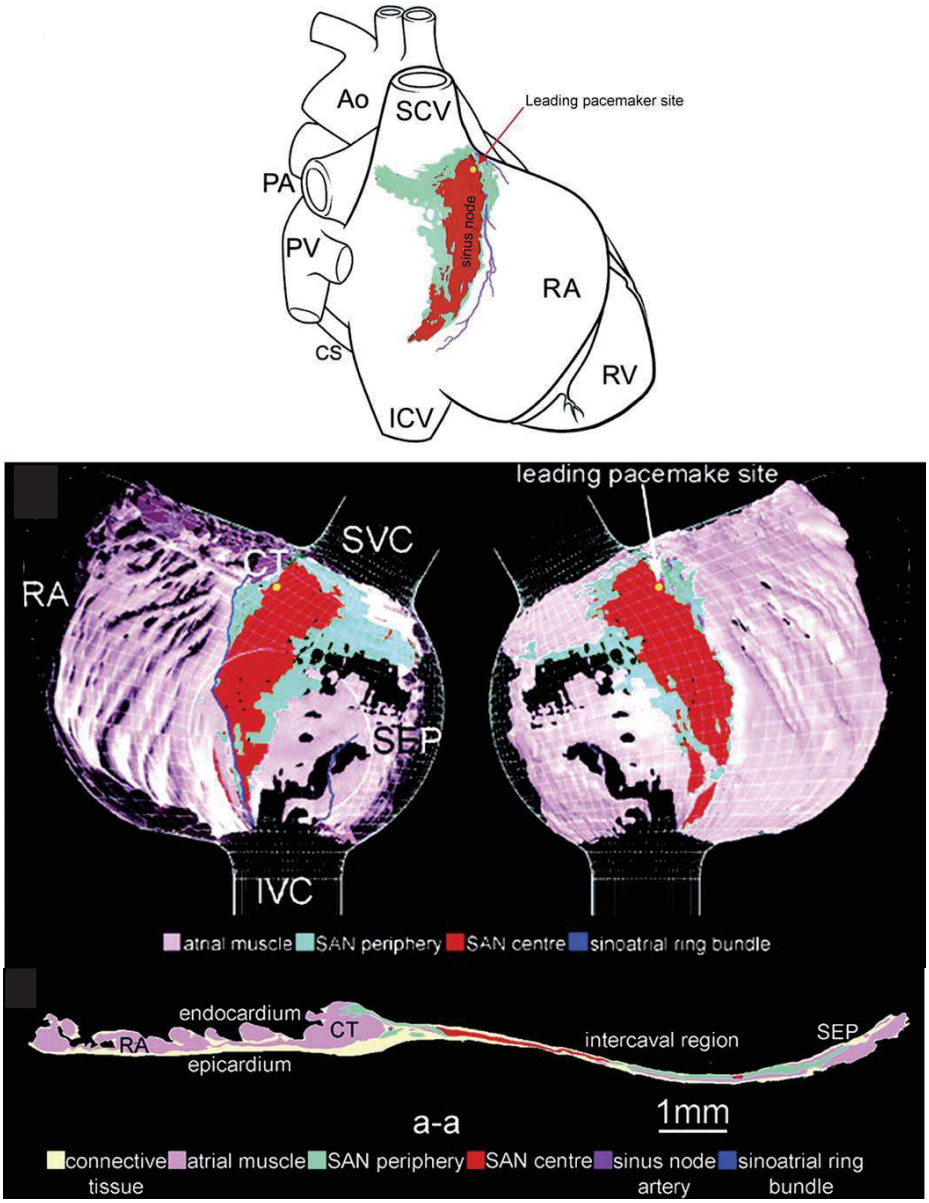


Figure 12: Modèle 3-Dimensionnel du NSA dans le tissu atrial. D'après Dobrzynski et al. 2005

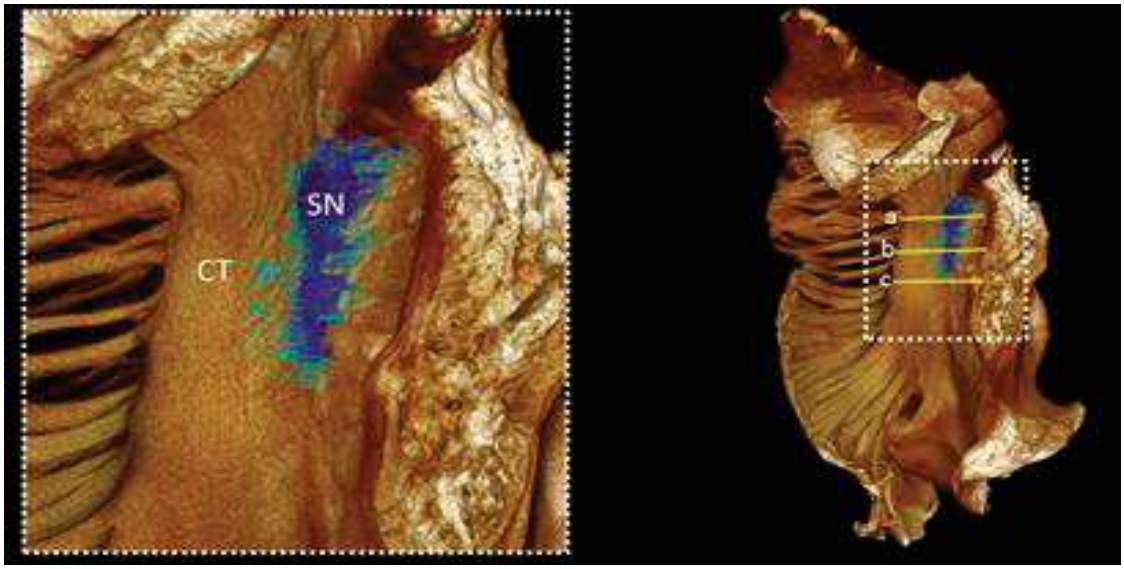


Figure 13: Modèle 3D de la zone pacemaker primaire (bleu foncé) et paranodale (bleu clair) en haute resolution. D'après Stephenson et al. 2017

Le NSA, en plus de contenir les cellules sinusales, est constitué d'une population hétérogène de cellules. Sa fonction contractile est limitée par la faible présence de myofilament est constitué d'au moins 45% de collagène, ce qui ne gêne en rien la conduction du signal (Opthof et al. 1987). Un fort pourcentage de fibroblastes est également présents mais ne participe pas à la conduction du signal (De Mazière et al. 1992).

Le NSA dans la structure propre ne contient pas le même type de cellule automatique. En effet on peut déterminer un NSA primaire et un NSA secondaire ou « zone de transition » qui ont été délimité de par leurs différences de propriétés électriques, et notamment par les différences de forme de potentiels d'action qu'elles pouvaient générer (Figure 14) (Verheijck et al. 2001).

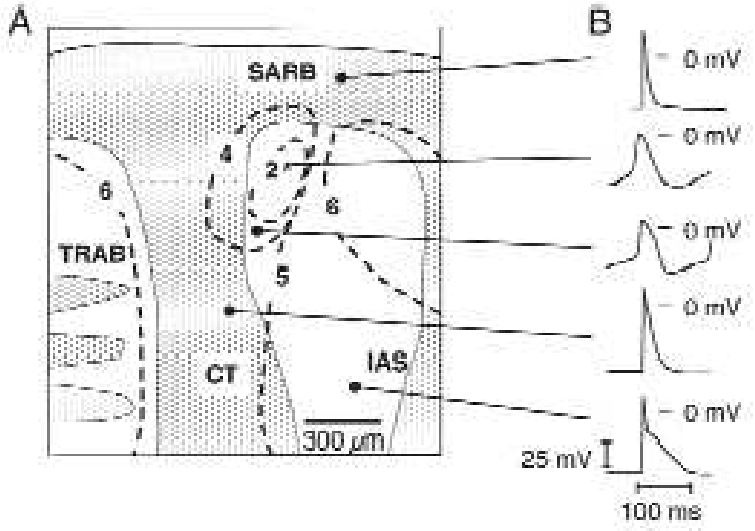


Figure 14: A : représentation du tissu nodal. B : enregistrement par microélectrode des potentiels d'action généré dans chacune des zones. CT : Crista Terminalis, SARB : branche droite de l'anneau sino atrial, IAS : septum inter atrial, TRAB : trabecule de l'oreillette.

Mais très récemment, le protéome du nœud sinusal a pu être étudié par spectrométrie de masse à haute résolution (Linscheid et al. 2019). Cette étude a permis de mettre en lumière certains aspects spécifiques de ce tissue nodal. Par exemple, la matrice extracellulaire du tissue nodal est notamment caractérisé par un enrichissement (contrairement au tissue atrial) en protéoglycanes à répétition riches en résidus de Leucine qui sont notamment impliqués dans la fixation du Ca^{2+} et la fibrogenèse (Kalamajski and Oldberg, 2010).

Lors d'une étude ayant pour objectif d'étudier le transcriptome du NSA humain et murins, plusieurs points importants ont été soulevé. Tout d'abord il a été observé que les clusters contenant le plus de gènes associés au NSA était des zones fonctionnellement liées à l'adhésion cellulaire et à la zone extracellulaire. De plus, la comparaison du transcriptome du NSA humain et murin a permis d'observer qu'un programme de gène était conservé dans les deux espèces. Ce programme contient notamment des facteurs de transcriptions effecteurs des gènes BMP et NOTCH, ainsi que des gènes liés à des protéines de liaison au calcium tel que SMOC2 et VSNL1. De plus, SMOC2, VSNL1 et ALOX8 ainsi que leurs protéines associées étaient de nouveaux marqueurs liés au développement et à la fonction du NSA (Van eif et al. 2019).

La conduction du signal : les jonctions communicantes

Comme vu précédemment, la présence de jonction communicantes sur l'ensemble du tissu cardiaque est primordiale pour le dromotropisme (qui a trait avec la vitesse de conduction d'un influx nerveux) cardiaque, elles ont en effet un rôle dans la propagation des PA et donc également dans la coordination de la contraction du myocarde (Gros and Jongsma, 1996).
Pour former une jonction communicante, six connexines (Cx), des protéines transmembranaires, vont constituer un connexon, qui forme un demi-canal. Lorsque que deux connexons se lient, cela donne un canal transmembranaire entre les cytoplasmes des deux cellules voisines (Figure 15).

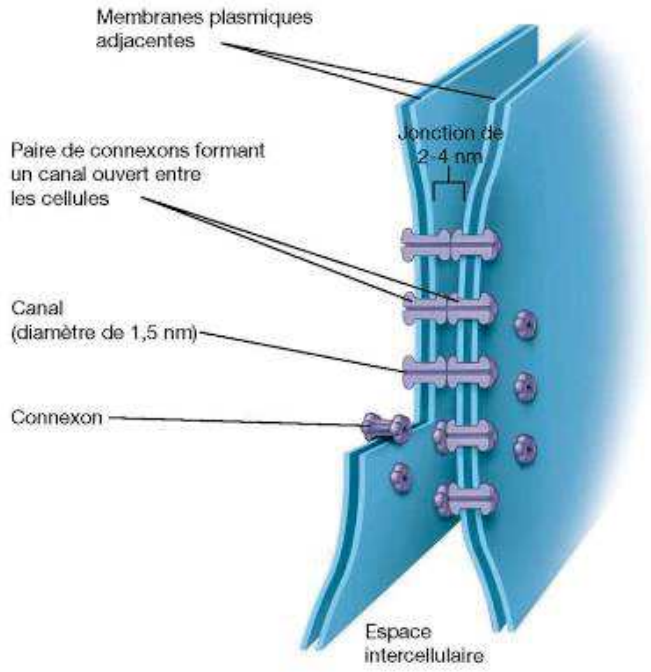


Figure 15: Illustration de la structure des jonctions communicantes

Il existe différentes connexines, et chacune va déterminer les propriétés fonctionnelles des jonctions communicantes (Gros and Jongsma, 1996), ici nous discuterons des connexines exprimées dans le tissu cardiaque.

Chez l'Homme, la Cx40 s'exprime dans les oreillettes, le NAV, le faisceau de His (Davis et al. 1995; Gros and Jongsma, 1996).

La Cx43 est l'isoforme cardiaque majoritaire. Chez l'Homme, on la trouve en forte densité dans les oreillettes et les ventricules ainsi que dans les cellules du faisceau de His et les fibres de Purkinje. On la retrouve en plus faible densité dans le NAV (Davis et al. 1995).

Une faible présence des Cx40 et Cx43 sur des brins distincts de cellules dans le tissu nodal a pu être observé, permettent la propagation de l'influx électrique du NSA vers le tissu auriculaire tout en évitant le contact entre les deux tissus (Dobrzynski H. et al. 2005; Verheijck et al. 2001).

La Cx45 est majoritairement exprimée dans le NSA (Figure 16) (Verheijck et al. 2001), le NAV et le faisceau de His. Sa densité dans le tissu nodal reste faible. La Cx45 présente également, par rapport à Cx40 et Cx43, une faible conductance. Ces caractéristiques permettent de protéger le tissu nodal de l'influence hyperpolarisante du tissu auriculaire (Dobrzynski H. et al. 2005; Verheijck et al. 2001).

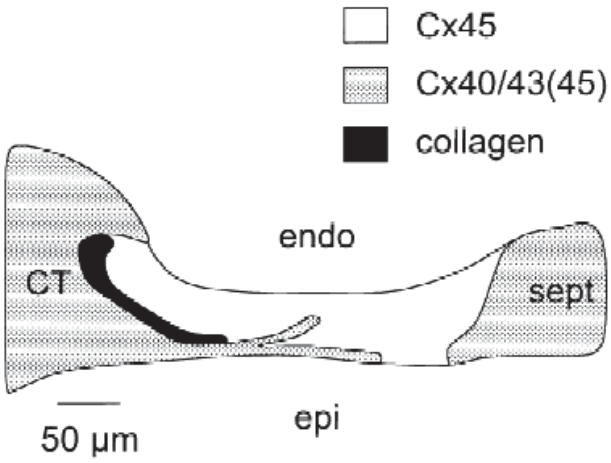


Figure 16: Illustration de la distribution des différentes connexines dans le NSA (en blanc) et son environnement direct. D'après Verheijck et al. 2001.

Le site d'initiation de l'activité pacemaker

Bien que le tissu nodal de la zone pacemaker accueille le site d'initiation de l'activité électrique cardiaque, il est admis que ce site d'initiation n'est pas un point fixe. En effet dès 1914, un déplacement du site d'initiation de l'activité pacemaker a été observé après une stimulation vagale (Meek and Eyster, 1914). Mais c'est également lors d'enregistrement d'ECG qui a confirmé cette information. En effet il a été observé que l'onde P changeait par exemple lors d'un effort physique (Irisawa and Seyama, 1966) ou bien d'un infarctus du myocarde (Grossman and Delman, 1969).

Grâce aux travaux de Opthof (Opthof, 1988), Kodama (Kodama et al. 1997) et Boyett (Boyett et al. 1998)(Boyett et al. 1999) , il a été déterminé que la localisation du site d'initiation de l'activité pacemaker à l'intérieur du nœud sinusal changeait en fonction des conditions de stimulation du rythme cardiaque (Figure 17).

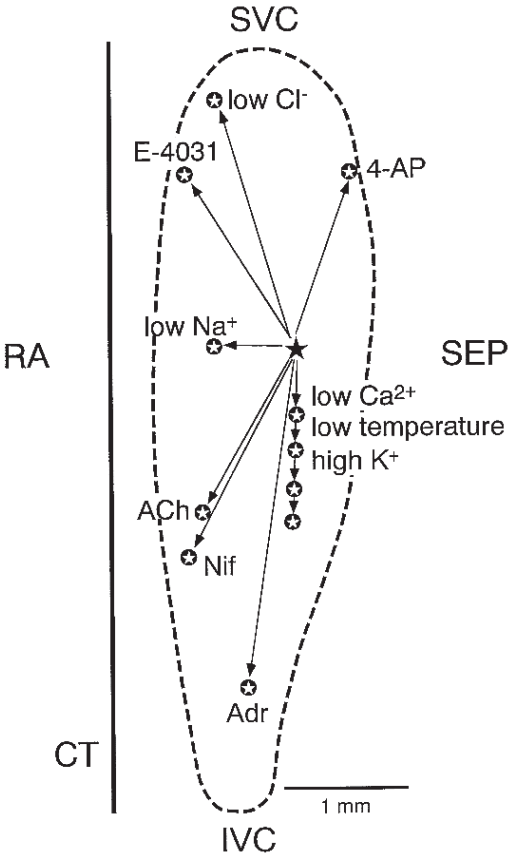


Figure 17: Les déplacement du site d'initiation de l'activité pacemaker en fonction de différents agents pharmacologiques ou ioniques. D'après Boyett et al. 2000.

Cependant bien que des déplacements puissent être observés, le site d'initiation n'est cependant pas localisé de manière aléatoire. En effet il semblerait que la localisation préférentielle soit assez éloignée de l'oreillette droite, mais dans une région où il y a une forte expression de canaux ioniques directement impliqués dans l'activité pacemaker ainsi qu'à une présence moins forte de myofilaments (Boyett et al. 2000).

Les canaux ioniques dans l'activité pacemaker

Les canaux ioniques sont des structures transmembranaires permettant le passage d'ions de part et d'autre de la membrane d'une cellule en fonction des gradients électrochimiques. Leur ouverture peut être contrôlée par le potentiel de membrane, la fixation d'un ligand à un récepteur, comme l'ACh au récepteur muscarinique, ou bien par la variation de la concentration intracellulaire de second messager tel que le Ca^{2+}, l'AMPc et l'IP3.
Les canaux présentent trois états possibles : ouvert, fermé et inactivé. A l'état ouvert, le canal est perméable aux ions, qui passeront donc en fonction d'un gradient électrochimique. Un canal fermé ne laissera pas passer les ions, mais pourra être activé immédiatement. A l'état inactivé, le canal est fermé, même si le potentiel de membrane serait compatible avec l'activation. L'état inactivé va alors persister pendent un temp défini avant de redevenir activable. L'état inactivé est à la base notamment de la période réfractaire qui contribue à empêcher l'induction de PA trop précoce.

Dans la cellule pacemaker, l'activité spontanée est la résultante de l'activité des différents canaux ioniques présents dans cette cellule. Nous allons passer en revue les propriétés de principaux canaux ioniques participant à la génération de l'automatisme.

Les canaux activés par l'hyperpolarisation f-(HCN)

La découverte du courant I_f

Dès les premières études des mécanismes responsables de la génération de la dépolarisation diastolique sur des fibres de Purkinje (Weidmann, 1951) , une diminution de la conductance de la membrane pendant la dépolarisation diastolique a été observé. Plus tard, il a été proposé que la dépolarisation diastolique dans les fibres de Purkinje résultait d'une diminution dépendante

du temps de la perméabilité aux ions K^+ (Vassalle, 1966). Il avait alors été proposé que la désactivation d'un courant K^+ (I_{K2}) serait responsable d'une partie de l'activité pacemaker dans les fibres de Purkinje (Noble and Tsien, 1968).

Dans le noeud sinoatrial, les expériences de voltage clamp avaient mis en évidence la présence d'une composante d'un courant entrant dépendant du Na^+ et du temps. Ce courant était activé à des voltages hyperpolarisés dans le sinus veineux de la grenouille et dans le nœud sinoatrial de lapin (Brown, Giles, and Noble 1977; Seyama, 1976). En 1979, ce courant fut nommé « le courant drôle » (funny, I_f) pour ses propriétés biophysiques uniques à l'époque, à savoir, une activation par hyperpolarisation et une dépendance mixte du Na^+ et du K^+ (Brown, DiFrancesco, and Noble 1979).

A la fin des années 70, la théorie de l'automatisme dans les fibres de Purkinje était basée sur I_{K2}, tandis qu'I_f, avait été proposé comme un mécanisme possible d'automatisme dans le nœud sinoatrial. Néanmoins, les courants I_{K2} et I_f semblaient présenter des similitudes et les deux courants commencèrent à être comparé (DiFrancesco and Ojeda, 1980) jusqu'à la réinterprétation du courant I_{K2} des fibres de Purkinje en courant I_f (DiFrancesco, 1982). La réinterprétation a démontré que ce courant I_{K2} des fibres de Purkinje était en fait généré par l'association entre le courant K^+ rectificateur entrant (I_{K1}) et I_f qui s'activait en hyperpolarisation dans la gamme de voltage correspondant à la dépolarisation diastolique (DiFrancesco, 1981a, 1981b). Ce travail de réinterprétation a abouti à la proposition que le courant I_f était responsable de l'automatisme du nœud sinusal ainsi que de celui des fibres de Purkinje (DiFrancesco and Noble, 1985).

Par la suite, la caractérisation de ce courant sur des cellules isolées du nœud sinoatrial de lapin (DiFrancesco, 1991), ainsi que la découverte que la probabilité d'ouverture des canaux f- est régulés directement par les nucléotides cycliques (DiFrancesco and Mangoni, 1994; DiFrancesco and Tortora, 1991)ont contribué à la proposition que I_f jouait un rôle essentiel pour l'activité pacemaker et sa régulation par le système nerveux autonome (DiFrancesco, 1993).

Structure

Les bases moléculaires du courant I_f ont pu être décrites à la fin des années 90, grâce au clonage de la famille des canaux activés par l'hyperperpolarisation et les nucléotides cycliques (HCN). Les canaux HCN, pour Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated, sont représentés par 4 isoformes clonées chez la souris (Santoro et al. 1998) puis chez l'homme (Seifert et al. 1999; Vaccari et al. 1999), de HCN1 à HCN4. Ils sont tous constitués de 6 segments

transmembranaires (S1-S6) et d'un senseur de potentiel positif au niveau du S4. Ces canaux sont activés par hyperpolarisation mais également par la liaison directe de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) au canal. Cette liaison permet la régulation du canal par le système nerveux autonome (DiFrancesco and Tortora, 1991). Pour cela l'AMPc va pouvoir se fixer à un domaine appelé Cyclic Nucleotid Binding Domain (CNBD) sur le domaine C-Terminal. Cela va permettre de modifier la cinétique d'activation du canal et va déplacer l'activation à des voltages plus positif. Cela entrainera une ouverture plus rapide du canal HCN4 et donc une augmentation du courant I_f (Xu et al., 2010; Zagotta et al. 2003). Cependant les isoformes ne sont pas toutes au même rang concernant ce dernier point. En effet, HCN1 présente la plus forte affinité pour l'AMPc, ce canal se comportant comme une « éponge » pour l'AMPc de la cellule. Par conséquent, les variations de l'AMPc n'ont qu'un très faible effet sur HCN1 (Lolicato et al. 2011). HCN2 et HCN4 ont une affinité prononcée pour l'AMPc, mais peuvent toutefois être modulés par les variations de la concentration de l'AMPc. HCN3 n'est aucunement modulé par l'AMPc (Stieber et al. 2005) (Figure 18).

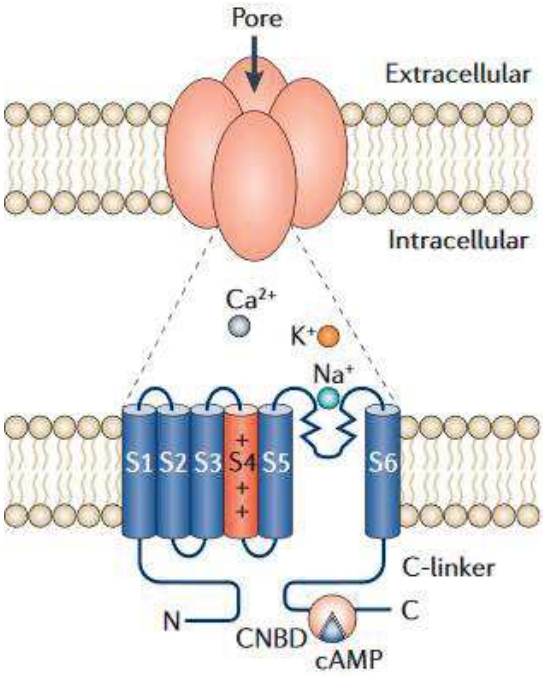


Figure 18: Illustration d'un canal HCN. En haut, représentation du tétramère ; en bas : Représentation d'un monomère avec ces 6 segments transmembranaires (dont le segment S4 en rouge contenant le senseur de voltage) ainsi que son domaine CNBD. D'après Postea et Biel, 2011.

Caractéristiques

La caractéristique principale des canaux HCN est de porter un courant qui s'active lors d'une hyperpolarisation du potentiel de membrane, contrairement à la grande majorité des courants ioniques connus qui eux s'activent lors d'une dépolarisation.
Il présente un seuil d'activation compris entre -50 et -65 mV dans les cellules du NSA et du NAV (Baruscotti, Bucchi, and DiFrancesco 2005). Mais dans les fibres de Purkinje, le seuil est déplacé à des valeurs encore plus négative : entre -90 et -60 mV (DiFrancesco 1981a).
Une autre caractéristique est que les canaux HCN sont cationiques non-sélectifs, cependant ils sont perméables au potassium et au sodium dont la perméabilité est quatre fois supérieure à celle des ions potassiques.

Il existe plusieurs inhibiteur au courant I_f comme par exemple l'Ivabradine (DiFrancesco and Camm 2004), qui va bloquer le canal HCN par son côté intracellulaire en se fixant sur le site de passage des ions (Figure 19), ou le ZD 7288 (DiFrancesco and Tortora, 1991; Gasparini and DiFrancesco, 1997; Shin et al. 2001). Le courant I_f est bloqué par les ions Cs+ à des potentiels hyperpolarisés) (DiFrancesco et al. 1986; Nikmaram et al. 1997).

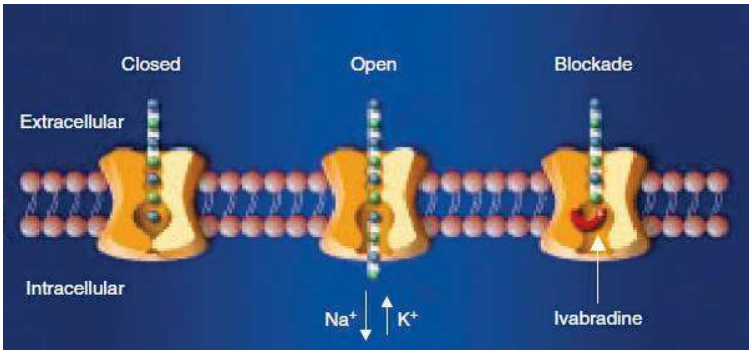


Figure 19: Schématisation de l'inhibition du canal HCN par l'ivabradine. D'après Dario DiFrancesco et Camm, 2004.

Expression

Dans le NSA, HCN4 est exprimé et c'est l'isoforme prédominante, et représente 80% des mRNAs codant pour les canaux HCN dans les cellules pacemaker. On y trouve également, avec

une expression beaucoup plus faible, HCN2 suivie de HCN1 (Stieber et al. 2004). Dans le cerveau, c'est HCN1 qui est l'isoforme majoritaire. Quel que soit le compartiment cardiaque testé, l'expression de HCN3 est difficilement détectable dans le cœur adulte (Marionneau et al. 2005). On retrouve HCN4 dans le NSA de souris, de lapin (Tellez et al. 2006) et chez l'Homme.

Les canaux calciques

Le rôle du Ca^{2+} en tant que second messager n'est plus à démontré. Il est en effet impliqué dans un grand nombre de processus intracellulaire tel que la contraction musculaire, la libération des neurotransmetteurs, l'excitabilité et la plasticité synaptique et lorsque que l'expression ou l'activité des canaux calciques activés par le potentiel (VGCC) responsables des courants calciques est modifié, cela entraine de lourdes conséquences telle que des maladies psychiatriques ou des arythmies cardiaques (Nanou and Catterall, 2018; Striessnig et al. 2014; Zamponi et al. 2015), ne faisant que confirmer le rôle crucial du Ca^{2+}.

La classification

A l'exception du canal calcique de type L- du muscle squelettique ($Ca_v1.1$), qui se compose de quatre sous-unités, les VGCC sont constitués de 3 sous-unités (Figure 20) :

La sous-unité α1 qui constitue un élément central dans la structure de ces canaux

La sous-unité β qui est liée à α1 sur sa face cytoplasmique

La sous-unité α2-δ, qui se place sur la face membranaire de α1.

Pour finir, le canal $Ca_v1.1$ possède aussi une sous-unité γ.

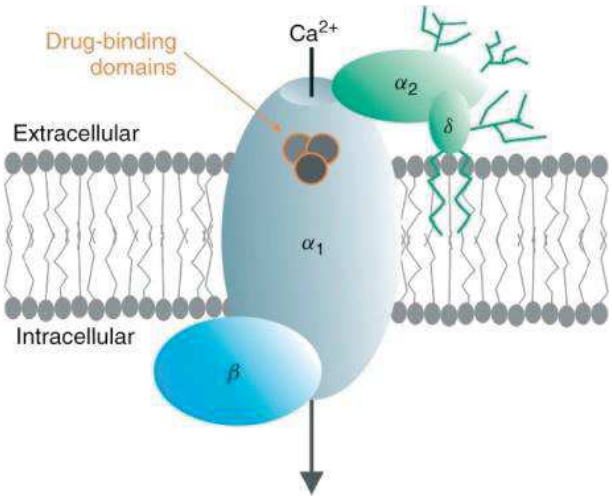


Figure 20: Représentation schématique des VDCC avec les sous-unités. D'après Striessnig et al, 2014

La sous-unité α1 est constituée de 4 domaines, qui contiennent eux-mêmes 6 segments transmembranaires. Chacun de ces domaines possèdent un senseur de potentiel au niveau du S4 et un segment transmembranaire formant le pore du canal. (Figure 21) (Mangoni et al. 2006a). Elle détermine donc la cinétique et la dépendance au voltage des VGCC (Dolphin, 2012).

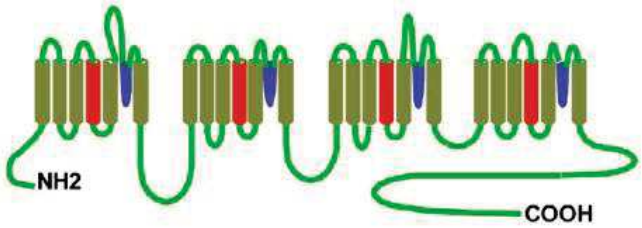


Figure 21: Représentation schématique de la sous-unité a1 des VGCC. D'après Mangoni et al. 2006

Les sous-unités β et α2δ sont, elles, responsables d'augmenter l'expression de canaux fonctionnels à la membrane, améliore le trafic des canaux calciques ou bien encore par exemple, l'ouverture du canal (Buraei and Yang, 2013; Dolphin, 2012). Concernant l'expression dans le NSA, ce sont les sous-unités auxiliaires α2-δ2 et β3 qui prédomine largement dans le NSA (Marionneau et al. 2005).

Grâce au codage de 10 isoformes de la sous-unité α1, la famille des VGCC peut être subdivisée en 3 sous-familles : les canaux calciques de type L, les canaux calciques de type T, et les canaux calciques de type N, R et P/Q ou appelés encore « non L » (Catterall, 2000) (Figure 22).

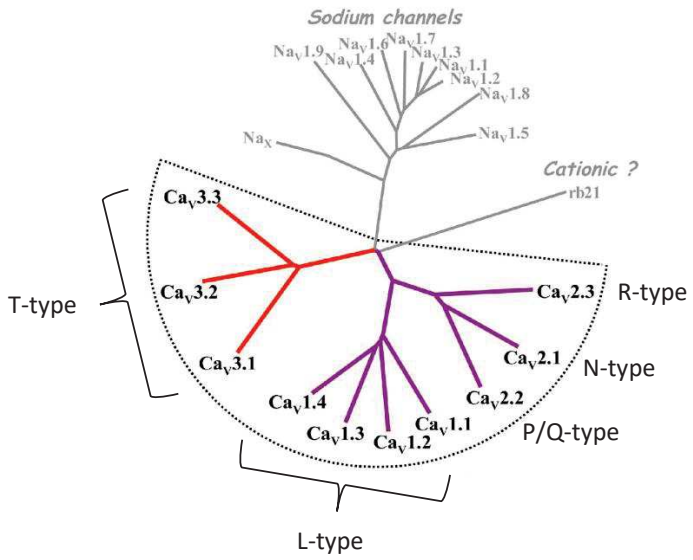


Figure 22: Gènes codants pour les 10 isoformes des VGCC. Adapté de Mangoni et.al 2006

Les LTCC

Structure

Tout en gardant la structure des VGCC, un élément particulier sur la structure des LTCC est la présence du domaine IQ (isoleucine-glutamine) sur la partie C-terminal du canal, c'est le site de fixation de la calmoduline. De par son activité de senseur calcique, la fixation de la calmoduline sur ce domaine va amener à la fermeture du canal (Christel and Lee, 2012). Les ions Ca^{2+} vont pénétrer dans le pore du canal et se lier à la calmoduline fixée sur le domaine IQ, ce qui va amener un changement de conformation qui augmente la probabilité d'inactivation du canal en mode calcium dépendant (CDI). La facilitation calcium dépendante appelée CDF fait rentrer en jeu la protéine kinase II Ca^{2+}/calmoduline-dépendante qui va se lier et phosphoryler la calmoduline sur le domaine IQ et ainsi augmenter la probabilité d'ouverture du canal. Il existe également sur les LTCC au niveau de la boucle entre les domaines I et II un motif permettant un changement de conformation du canal dépendant du voltage. Cela permet

les mécanismes de VDF (« Facilitation voltage-dépendante ») et de VDI (« Inactivation voltage-dépendante).

Les LTCC peuvent également être régulé par une protéine appelée Rad lors de la régulation adrénergique. Une stimulation β-adrénergique entraine alors la phosphorylation PKA-dépendante de cette protéine pour activer le courant LTCC, permettant ainsi à ce courant de participer à l'augmentation de l'automatisme cardiaque dans le NSA. En effet, des cellules pacemaker KO pour Rad présente un I_{CaL} qui ne répond plus à une stimulation adrénergique (Levitan et al. 2021).

Caractéristiques

Les LTCC sont des canaux calciques ayant un seuil d'activation variable, ils portent un courant calcique de type L qui est activé à des potentiel compris entre -50 et -30 mV et présente une inactivation Ca^{2+} et voltage dépendante (Hagiwara et al. 1988; Me et al. 2000). En observant les propriétés des canaux calciques présents, à savoir $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$, c'est $Ca_v1.3$ qui présentent les propriétés d'activation et d'inactivation les plus cohérentes à la phase de dépolarisation diastolique du PA sinusal (Mangoni et al. 2006a) (Figure 23). Il est important de noter que les canaux $Ca_v1.3$ s'ouvrent par dépolarisation pour le potentiel de membrane intermédiaires entre les canaux de type T $Ca_v3.1$ et les canaux de type L $Ca_v1.2$ qui couplent l'excitation à la contraction dans le myocarde de travail. La courbe d'inactivation des canaux $Ca_v1.3$ est positionnée entre celle des canaux $Ca_v3.1$, qui sont très peu disponibles à l'état stable à potentiels diastoliques (10%) et celle des canaux $Ca_v1.2$ que, bien que disponibles pour l'ouverture, s'ouvrent à des potentiels correspondants à la phase de montée du potentiel d'action. Par conséquent, les canaux $Ca_v1.3$ ont une forte disponibilité à l'ouverture dans l'intervalle diastolique (80-70%) et une probabilité d'ouverture compatible avec le potentiel du pacemaker. Il est possible que le rôle des canaux $Ca_v1.2$ soit plus restreint à la phase de montée du potentiel d'action comme dans les myocytes du myocarde de travail (Mangoni et al. 2006a).

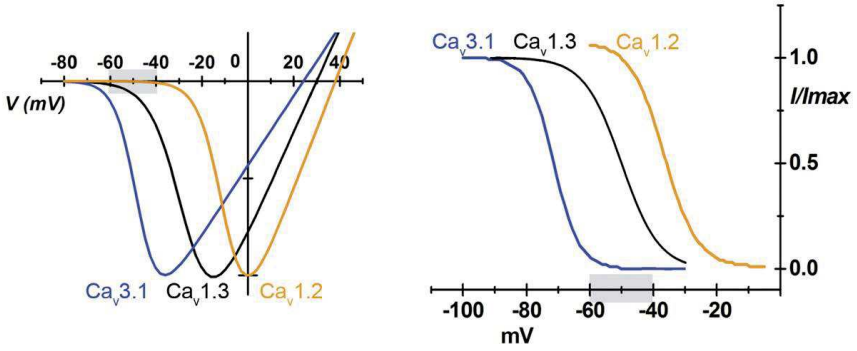


Figure 23:Courbes courant-voltage et courbes d'inactivation des trois courants calciques de la cellule du NSA (en gris : valeurs de potentiel de membrane correspondants à la dépolarisation diastolique. D'après Mangoni et al. 2003

Afin d'étudier les effets phénotypiques et le rôle fonctionnel du canal $Ca_v1.3$, la souris *$Ca_v1.3^{-/-}$* a été généré par l'équipe de Jörg Striessnig (Institut de pharmacologie d'Innsbruck, Autriche) (Platzer et al. 2000) .Au niveau du fonctionnement cardiaque, ces souris présentent, entre autres, des dysfonctions sinusales, à savoir des phases d'arythmies et de bradycardie ainsi qu'un défaut de la conduction auriculo-ventriculaire.

Ces souris ont notamment permis dans l'équipe de montrer à quel point $Ca_v1.3$ était important pour la génération d'un automatisme cardiaque de base, en effet, sans ce canal, la fréquence des PA du NSA est lente et très variable (Torrente et al. 2016) (Figure 21). A noter que les cellules pacemaker de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présentent un potentiel d'action normal, ce qui suggère un rôle pour l'isoforme $Ca_v1.2$ dans cette phase.

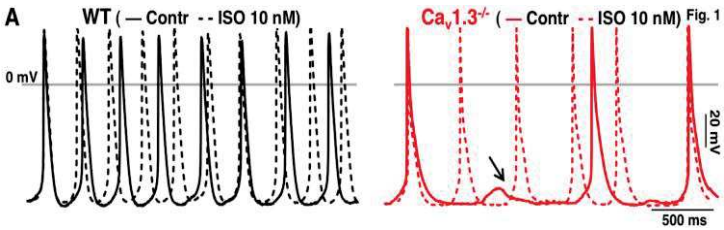


Figure 24: Enregistrement de PA chez la souris WT et la souris $Ca_v1.3$-/- en condition contrôle et en condition ISO. D'après Torrente et al. 2016)

Une autre différence qui existe entre les LTCC et les TTCC est leur sensibilité différentielle aux dihydropyridines (DHP) telles que la nifédipine. En effet il est admis que les DHP touchent les LTCC alors que les TTCC y sont insensibles (Catterall et al. 2003; Hagiwara et al. 1988). Ils sont également régulés par une phosphorylation dépendante de la protéine kinase A (PKA) (Ma et al. 2005) (ce dernier point sera plus amplement discuté postérieurement). Leurs activités dépend également de la protéine kinase II Ca^{2+}/calmoduline-dépendante qui régule l'activation et la réactivation du courant (Vinogradova et al. 2000).

Expression

Concernant les isoformes des LTCC, $Ca_v1.1$ est responsable du couplage excitation/contraction et est majoritaire présente dans les muscles striés squelettiques (Tanabe et al. 1988) et faiblement présente dans le cœur en tant que mRNA codant, mais probablement non fonctionnel (Marionneau et al. 2005). $Ca_v1.4$ est présent dans la rétine (Baumann et al. 2004; Striessnig and Koschak, 2008). $Ca_v1.2$ lui est exprimé dans l'ensemble du cœur (B et al. 2007; Marionneau et al. 2005), le muscle lisse (Moosmang et al. 2003), le cerveau, les glandes surrénales (Moosmang et al. 2005), ainsi que dans le pancréas (Schulla et al. 2003).

$Ca_v1.3$ est exprimé dans le cerveau, le pancréas, la cochlée ainsi que dans le NSA et le NAV bien que son expression soit plus faible que celle du canal $Ca_v1.2$, également présent dans les tissus nodaux chez la souris (Marionneau et al. 2005), le lapin (Tellez et al. 2006), et l'Homme.

Les TTCC

Structure

La différence majeure de la structure de la sous-unité □1 TTCC par rapport à celle des LTCC est la présence d'un motif appelé « helix-loop-helix » qui est l'équivalent du motif « IQ » à haute affinité pour la calmoduline que l'on retrouve chez les LTCC (Chemin et al. 2017). Cependant tous les TTCC ne sont pas sensibles au calcium, en effet si $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.3$ y sont sensible, une étude a montré que $Ca_v3.2$ ne l'était pas (Cazade et al. 2017). Concernant la CDF, tous les TTCC n'ont pas le résidu sérine permettant la régulation par la protéine kinase II Ca^{2+}/calmoduline-dépendante, ce qui est le cas du canal $Ca_v3.1$ (Welsby et al. 2003) (Figure 25). Pour les TTCC, la VDF et la VDI concerne les domaines I, III et IV.

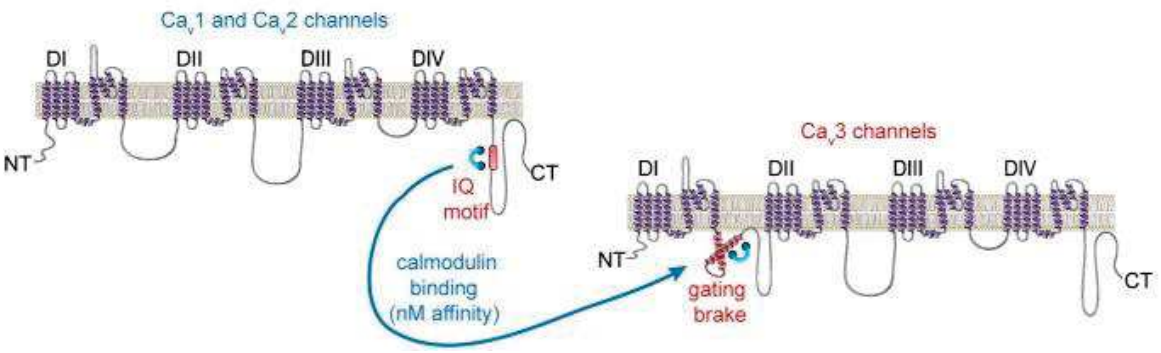


Figure 25: Illustration de la différence de structure entre les TTCC et la structure des LTCC. D'après Chemin et.al, 2017

Caractéristiques

Les TTCC sont des canaux calciques à bas seuil d'activation, c'est-à-dire que le courant calcique de type T qu'ils portent s'activent à des potentiels entre -60 et -50 mV et ce courant démarre son inactivation à -90 mV pour être complètement inactivé aux alentours de -40 mV (E, 2003; Hagiwara, Irisawa, and Kameyama 1988).

Expression

Il existe 3 gènes codant pour des canaux calciques de type T : $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$. Cependant, il apparait que $Ca_v3.3$ ne soit pas exprimé dans le cœur (Monteil et al. 2000)et elle est exclusivement neuronale. $Ca_v3.2$ constituerait l'isoforme prédominante dans le cœur embryonnaire (L et al. 2002; Ll et al. 2001). En étudiant l'expression des canaux calciques dans le NSA, il est apparu que c'était $Ca_v3.1$ qui était le TTCC exprimé de façon prédominante (Marionneau et al. 2005), et de façon global cette isoforme est présente sur le tissu conducteur cardiaque.

Les canaux calciques à haut seuil d'activation

Les canaux de type « non L » ou les canaux N, P/Q et R-type sont des canaux calciques à haut seuil d'activation. Ils sont exprimés dans les terminaisons nerveuses dans lesquelles ils initient

les transmissions synaptiques rapides (Catterall, 2000), et dans les dendrites mais également dans les cellules chromaffines situées dans les glandes surrénales (Fox et al. 2008).

Les canaux potassiques

Le canal GIRK1/4

La découverte

C'est en 1958 que l'on a pu observer que l'ACh avait pour effet d'augmenter la perméabilité à la membrane aux ions potassiques (K^+) sur les cardiomyocytes, les cellules atriales et sinusales. Il a alors été proposé que l'augmentation de perméabilité au K^+ par l'ACh était le mécanisme majeur responsable du ralentissement de l'activité pacemaker par le système nerveux parasympathique (Trautwein and Dudel, 1958). On découvre plus tard que l'ACh se fixe à ces cellules grâce à des récepteurs muscariniques spécifiques M2 et cette fixation va avoir pour conséquence l'activation d'un courant potassiques spécifique (Noma et al. 1979) qui sera nommé I_{KACh}.

Structure

Ce courant est porté par un complexe tétramériques pouvant être formés par les isoformes GIRK1-4 (G-protein regulated inward-rectifier potassium channels, aussi nommées Kir3.1-Kir3.4) (Wickman and Clapham, 1995). Dans le cœur, ce sont les gènes GIRK1 et GIRK4 qui déterminent le courant I_{KACh}. GIRK1 et GIRK4, s'associent en hétéromères et formant le canal GIRK1/4 (Wickman et al. 1999). Mais alors que l'expression du courant I_{KACh} dans le ventricule est très hétérogène (Yang et al. 1996), ces canaux sont fortement exprimé dans le NSA, le tissu atrial et le nœud atrioventriculaire (DiFrancesco et al. 1989; Giles and Noble, 1976; Noma and Trautwein, 1978).

Caractéristiques

En plus d'une ouverture ACh-dépendante, ce canal a également la possibilité d'être ouvert par l'Adénosine (Ado) (Kurachi et al. 1986), un nucléoside qui se fixe sur son récepteur

purinergique A1 sur la cellule pacemaker. En effet une étude a déterminé que après avoir mesuré la conductance et les propriétés cinétiques des courants de la cellule entière et d'un seul canal, en présence d'ACh et d'Ado, ces deux molécules régulent les même courants potassiques I_{KACh} (Belardinelli et al. 1995; Kurachi et al. 1986).

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de ce canal, un outil pharmacologique a été développé. Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés appelé tertiapine-Q qui a un effet inhibiteur sur les canaux GIRK (Gauldie et al. 1976 ; Xiaobing Xu and Nelson 1993) et notamment une forte affinité pour le canal GIRK1/4.

Les canaux potassiques voltages dépendants

Dans la cellule pacemaker sont présents des canaux potassiques voltage dépendants (VDKC) identifié et portant deux courants rectifiants rapide, I_{Kr} et I_{Ks}, ainsi qu'un courant transitoire sortant I_{to} avec une composante rapide, $I_{to,f}$ et lente, $I_{to,s}$.

Structure

Les canaux portant le courant I_{Kr} sont codés par la famille des gènes ERG composées de ERG1 à ERG3. Dans le cœur humain, c'est HERG1 qui est responsable du courant I_{Kr} (Pond et al. 2000).

Concernant le courant I_{Ks}, les canaux le portant sont codés par trois gènes allant de KCNQ1 à KCNQ3, est c'est le gène KCNQ1 qui est responsable du courant I_{Ks} cardiaque (Nerbonne, 2000).

Ces canaux sont tous deux portés par des tétramères présentant une structure similaire avec des sous-unités constitués de 6 segments transmembranaires, dont le S4 porte le senseur de voltage et le S5-6 porte le pore du canal.

Ce qui va différencier ces canaux c'est une sous-unité que leur structure contient et qui donneront leur nom à ces deux VDKC.

Le canal responsable du courant I_{to} est codé par les gènes Kv1 et Kv4 (Nerbonne et al. 2001). La composante lente $I_{to,s}$ etant portée par le canal Kv1.4 et la composante rapide $I_{to,f}$ par des hétéromultimères de sous-unités de canaux Kv4.2, Kv4.3 ainsi que de KChIP2, une protéine interagissant avec l'extrémité cytoplasmique de Kv4 (An et al. 2000; Guo et al. 2002).

Caractéristiques

Les courants I_{Kr} et I_{Ks} sont tous les deux activés lors d'un épisode de repolarisation du potentiel de membrane. I_{Kr} est activé à partir d'un seuil de -50 mV. Ils s'activent graduellement au fur et à mesure de cette repolarisation afin d'y participer. Cependant I_{Ks} a une cinétique d'activation plus lente et une désactivation plus rapide que I_{Kr}.

Pour les composantes rapide et lente du courant I_{to}, leur nom provient de leurs cinétiques d'inactivation rapide ($I_{to,f}$) et lente ($I_{to,s}$) (Xu et al. 1999).

Expression

Dans le NSA de la souris, les ARN messager des trois isoformes connues d'ERG1 : 1a, 1a', et 1b ont été trouvés (Clark et al. 2004). Cependant, la composition précise des canaux portant ce courant dans le tissu conducteur cardiaque n'a pas encore été élucidée.

Cependant il semble exister une certaine disparité en fonction des espèces et du tissu cardiaque. Chez l'homme, l'expression de la protéine HERG1 est plus élevée dans le tissu ventriculaire que dans le tissu auriculaire alors que chez le rat, l'expression de la protéine ERG1 est plus élevée dans les oreillettes que dans les ventricules alors que (Pond et al. 2000).
Au sein même du NSA, chez le furet, la protéine ERG est plus fortement exprimée dans les zones attenantes à la CT par rapport aux zones les plus éloignées de la CT. Cette hétérogénéité d'expression est une des nombreuses explications concernant les différences dans la repolarisation du PA dans le NSA (Brahmajothi et al. 1997; Boyett et al. 2000).

Concernant l'hétérogénéité de I_{Kr} et I_{Ks} dans le NSA, des fortes densités de ces deux courants ont été enregistrées dans les grandes cellules par rapport à de plus petites cellules. Cependant les plus petites d'entre elles ne semblent exprimer que I_{Kr} (Lei et al. 2001).

Concernant le courant I_{to}, bien que les gènes codant le canal aient été identifiés, leur distribution dans le NSA reste encore à être élucidé. Cependant il semble que la densité de ce courant soit corrélée avec la taille des cellules.

Les canaux sodiques Nav1.1 et Nav1.5

Dans le cœur, le courant sodique (I_{Na}) est majoritairement porté par deux canaux : les isoformes Nav1.1-1.4 dites « neuronales » et l'isoforme Nav1.5 dites cardiaque (Lei et al. 2004). Ces deux canaux font partie de la famille des canaux sodiques voltage-dépendant (VGSC pour Voltage-Gated Sodium Channel).

Structures

Les VGSC sont des protéines transmembranaires constitués de 4 hélices α, elles même constituées de six segments transmembranaires. Chacune de ces hélices portent un senseur de voltage sur son quatrième segment transmembranaire (Figure 26).

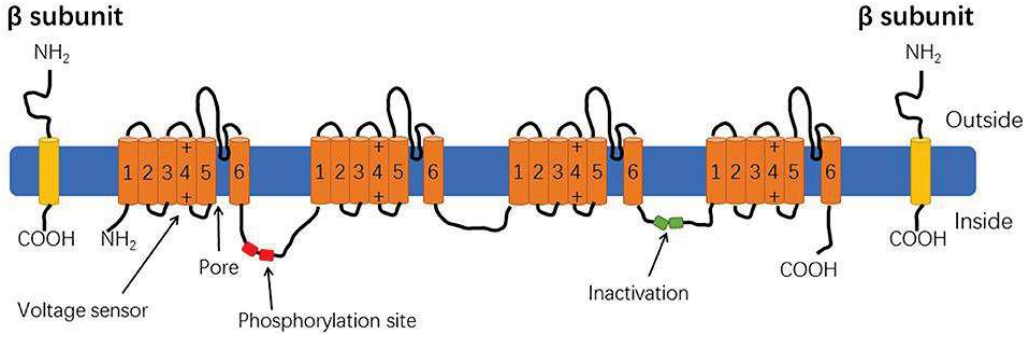


Figure 26: Structure d'un VGSC. D'après Mao et al. 2019

A l'heure actuelle, neuf isoformes de la sous-unité α de ces canaux ont été clonés, allant de Nav1.1 à Nav1.8, ici seront discutés le cas du Nav1.1 et Nav1.5.

Caractéristiques et expression

Ces deux canaux peuvent également se distinguer par leur sensibilité différente à la tétrodotoxyne (TTX). L'isoforme Nav1.1 est dite « TTX-sensible » et l'isoforme Nav1.5 est dite « TTX-résistante » (Catterall et al. 2020).

Afin de différencier l'expression de Nav1.1 et 1.5 dans le NSA et sa périphérie, c'est leur différence de sensibilité à la TTX qui a été utilisé (Baruscotti et al. 1997; Baudot et al. 2020; Li et al. 2020; Maier et al. 2003):

Tout d'abord, de faibles doses de TTX permettant de bloquer Nav1.1 (50-100 nM) ont été appliquées sur des nœuds sinusaux intacts ou des préparations de cellules isolées de la même origine, cela a conduit à un ralentissement de l'activité pacemaker sans pour autant toucher la vitesse de conduction du signal.

Ensuite, de plus fortes concentrations de TTX (30 µM) , permettant de bloquer Nav1.1 (TTX sensible) mais également Nav1.5 (TTX résistant), ont été utilisées. Cette fois ci, non seulement un ralentissement de l'activité pacemaker a été observé mais également un ralentissement de la vitesse de propagation du signal.

D'après ces résultats, on peut conclure que Nav1.1 est l'isoforme impliquée dans la génération des potentiels d'action dans le nœud sinusal, alors que l'isoforme Nav1.5, présent à la périphérie du nœud sinusal, est impliqué dans la propagation de l'activité électrique dans les tissus environnants (Lei et al. 2004).

Le cas particulier du courant I_{st}

En 1995, une étude a mis en lumière un nouveau courant entrant persistant de Na^+ dans les cellules du NSA de lapin. Ce courant a été nommé I_{st}, car contrairement au courant I_{CaL} classique, il possède une cinétique d'inactivation très lente. Lors de sa découverte, il est apparu qu'il était sensible aux bloqueurs des canaux calciques mais insensible à la TTX. Ce courant présentait également une sensibilité aux DHPs. Bien que I_{st} soit porté par des ions Na^+, on a pu exclure une contribution de l'échangeur Na^+/ Ca^{2+} dans la génération de ce courant. Toutefois,

sa sensibilité aux DHPs suggérait l'implication d'un nouveau sous-type de canal calcique de type L (Guo et al. 1995). Comme ce courant n'a été retrouvé que dans les cellules du NSA qui battaient spontanément, il a été proposé que ce courant devait jouer un rôle important dans la génération de l'automatisme cardiaque (Mitsuiye et al. 2000) d'autant plus que c'est un courant s'activant aux alentours de -70 mV, c'est-à-dire dans l'intervalle de voltage correspondant à la dépolarisation diastolique. Et par sa sensibilité à l'isoprénaline et à l'ACh, il a été proposé qu'il pouvait aussi jouer un rôle dans la modulation de cet automatisme par le système nerveux autonome (Toyoda et al. 2005). Il faudra attendre 2017 pour déterminer que l'expression des canaux $Ca_v1.3$ est une composante essentiel à la génération du courant I_{st} (Toyoda et al. 2017). Cependant les mécanismes exacts par lesquels le canal $Ca_v1.3$ génère le courant I_{st} restent encore à élucider.

La dynamique calcique intracellulaire de la cellule pacemaker

Dans la cellule pacemaker, le Ca^{2+} joue un rôle important dans l'automatisme et la genèse des PA. Bien que les canaux calciques jouent un rôle fondamental, les acteurs de la dynamique calcique intracellulaire sont également nécessaires.

C'est une première étude sur l'oreillette droite de chat qui a mis en évidence qu'une composante médiée par le calcium libéré du réticulum sarcoplasmique contribuait à la dépolarisation diastolique, et plus précisément lors de la phase exponentielle de la dépolarisation diastolique (Rubenstein and Lipsius, 1989). A partir de cette découverte, de multiples études ont étudié le rôle que la dynamique calcique intracellulaire dans la cellule pacemaker pouvait avoir dans l'automatisme cardiaque.

L'échangeur NCX dans l'automatisme cardiaque

L'échangeur NCX est un élément clé de l'homéostasie calcique intracellulaire. En effet c'est lors de la dépolarisation diastolique et de la phase de plateau du PA (voir chapitre suivant) que son activité est stimulée afin d'extruder le Ca^{2+} intracellulaire.

C'est en 1984 que la preuve de la présence de l'échangeur NCX dans les cellules pacemaker a été apportée grâce à des techniques de patch clamp et à un modèle numérique du NSA (Brown et al. 1984). Plus tard, des études ont montré que NCX participait à l'activité pacemaker chez les mammifères. En effet, en étudiant des cellules du NSA de cochon d'inde ou de lapin avec une solution extracellulaire dont le sodium a été remplacé par le lithium afin de bloquer l'activité du NCX, on a pu montrer que l'activité pacemaker ralentissait d'abord, pour s'arrêter complétement dans un deuxième temps. (Bogdanov et al. 2001; Sanders et al. 2006).

Des souris NCX KO ont alors été générées afin de pousser la compréhension du rôle de l'échangeur dans l'automatisme cardiaque. Tout d'abord, ces souris présentent des cellules isolées du NSA quiescentes. Ensuite, sur NSA intact, une technique de cartographie optique (plus de détails dans le chapitre Matériels et Méthodes) met en lumière des dépolarisations arythmiques et désorganisées. Et enfin, la microscopie confocale, met en lumières une activité calcique intermittente, oscillants de façon désorganisée entre des « burst » ou rafales calciques suivies de longues pauses (Figure 27) (Torrente et al. 2015). Cet état serait alors dû à une surcharge calcique dans la cellule, entrainant ainsi l'inactivation du courant I_{CaL} par le phénomène de CDI.

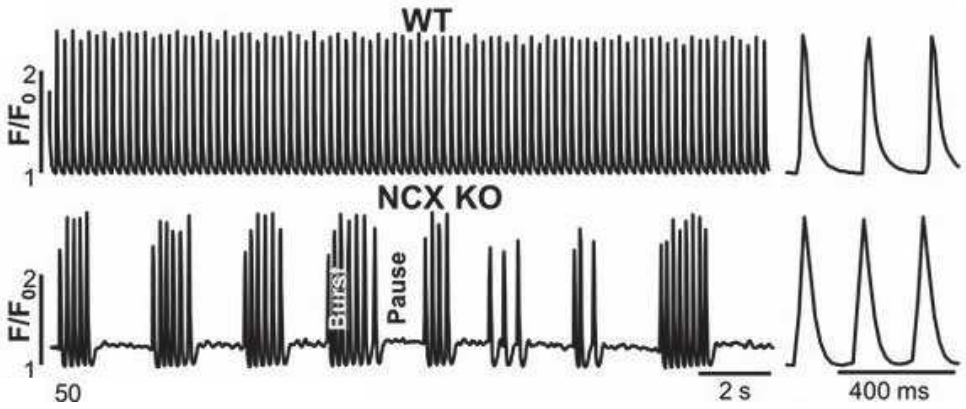


Figure 27: Moyenne de fluorescence (microscopie confocale) normalisée à la ligne de base de l'activité calcique de cellules de souris WT (activité uniforme) ou de souris NCX KO (activité de « burst » ou rafale suivie de pause).

Le mécanisme pacemaker : Les concepts qui divisent

A la lumière de tous ces éléments cellulaires impliqués dans l'activité pacemaker, plusieurs concepts ont vu le jour pour expliquer le mécanisme responsable de l'automatisme. Le premier modèle a mis l'accent sur l'activité de canaux ioniques de la membrane plasmique, comme I_f et I_{CaT}, tandis que des modèles suivants, ont mis l'accent sur le rôle de la dynamique intracellulaire du Ca^{2+} et de l'échangeur NCX. De ce fait, les termes d 'horloge de membrane « *membrane clock* » et d'horloge calcique « *calcium clock* », sont rentrés dans l'usage courant. Ils seront brièvement discutés ici.

Le « membrane clock »

Le « *membrane clock* » est le concept qui attribue l'origine de l'automatisme cardiaque à l'activité des différents canaux ioniques présents sur la surface de la membrane plasmique des cellules pacemaker. L'origine de l'automatisme réside dans l'activation dépendante du temps des courants entrants dépolarisants et sortants, contrôlant la repolarisation. Les courants ioniques tels qu'I_f, I_{CaL}, I_{CaT} et I_{st}, sont responsables de la phase de dépolarisation diastolique des PA du NSA, tandis que I_{Kr}, I_{Ks} et I_{to} participent à la repolarisation. Un nombre important de modèles numériques de l'automatisme du NSA basés sur ce concept ont été proposés (Wilders, 2007). De plus amples détails concernant la synergie de ces canaux ioniques pour perpétuer l'automatisme cardiaque seront donnés dans la section suivante.

Le « Calcium clock »

Le modèle du « calcium clock » attribue la génération de l'automatisme cardiaque à un phénomène de libération spontanée de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique par les récepteurs RyR et indépendante des changements de voltage de la membrane plasmique. Le Ca^{2+} clock est rendu possible par une production basale de AMPc élevée dans la cellule pacemaker (Vinogradova et al. 2004). La voie AMPc dépendante stimulerait ainsi l'activité des RyRs générant des libérations locales de Ca^{2+} (LCR : « Local Ca^{2+} Release »). Au cours du cycle pacemaker, le remplissage du réticulum sarcoplasmique au cours du potentiel d'action génère des LCR pendant la phase tardive de la dépolarisation diastolique. Cette libération de Ca^{2+}

active à son tour l'échangeur NCX, générant un courant qui permet aux cellules du SAN de se dépolariser jusqu'au seuil du PA suivant (Lakatta et al. 2010).
Le modèle du *membrane clock* et du *calcium clock* ont été intégrés dans un modèle numérique général de l'automatisme, appelé *coupled clock* (Maltsev and Lakatta, 2009).

Le modèle de l'horloge couplée (*coupled clock*) pour expliquer l'automatisme

Le courant calcique de type L, porté par $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$, est important pour l'automatisme cardiaque (voir section précédente). En effet, lorsque que ce courant calcique est dérégulé, on observe une forte perturbation de l'activité pacemaker, ainsi que des arythmies cardiaques. Dans une section précédente, nous avons discuté l'importance des canaux de type L- $Ca_v1.3$ dans la dépolarisation diastolique et dans la génération du courant I_{st}. Toutefois, les canaux $Ca_v1.3$ sont aussi connectés à la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire, d'une part car ils génèrent une entrée de Ca^{2+} durant la phase diastolique. Cet aspect est d'une importance particulière, car le modèle le plus courant de l'activité pacemaker, le modèle de l'« horloge couplé » (*coupled clock*), propose que le l'activité pacemaker est le résultat de la synchronisation entre l'activation séquentielle des canaux ioniques de la membrane plasmique et la libération diastolique de Ca^{2+} par les RyR2 . En particulier, le modèle du *coupled clock* propose que la dépolarisation diastolique soit initiée par les phénomènes de libération locale spontanée de Ca^{2+} par les récepteurs RyR2 du Ca^{2+} clock. Les LCR stimuleraient l'activité de NCX qui génère ainsi un courant entrant. Le courant I_{NCX} génère la dépolarisation diastolique en coopération avec I_f et I_{CaT}. La dépolarisation diastolique amène le potentiel de membrane au seuil d'activation de I_{CaL}. L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule au cours du potentiel d'action permet la recharge du réticulum sarcoplasmique, permettant ainsi un nouveau cycle d'activation spontanée des LCRs diastoliques (Lakatta et al. 2010). Dans sa version couramment acceptée, le modèle du *coupled clock* assigne un rôle secondaire au canaux Ca^{2+} de type L, lesquels ne feraient pas partie du mécanisme pacemaker, mais favoriseraient la dernière partie de la dépolarisation diastolique, ainsi que le maintien de la charge du réticulum sarcoplasmique (Lyashkov et al. 2018).Toutefois, cette vision du pacemaker ne prend pas en considération les résultats de plusieurs études sur le rôle fonctionnel de $Ca_v1.3$.

Tout d'abord, un modèle murin de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (CPVT : « Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia ») associée à une bradycardie sinusale a permis de démontrer qu'une augmentation de la libération diastolique de Ca^{2+} n'est pas forcement liée à une augmentation de la fréquence pacemaker, ce qui est attendu par le modèle du *coupled clock*. En particulier, dans cette étude il a été montré que les libérations excessives et non synchronisées de Ca^{2+} par RyR2 inactivaient I_{CaL} et le rendent insensible à la stimulation adrénergique (Neco et al. 2012). Ces résultats ont suggéré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les canaux $Ca_v1.3$ et les récepteurs RyR2.

Interaction fonctionnelle entre les canaux $Ca_v1.3$ et les récepteurs RyR2

Notre équipe a démontré que $Ca_v1.3$ est colocalisé avec les récepteurs RyR2 dans les structures sarcomériques, contrairement aux canaux de type L $Ca_v1.2$. De plus, dans un modèle numérique de NSA de souris, cela a amené à l'observation d'une amélioration de l'activité pacemaker après des pauses, ainsi qu'une amélioration de la réponse du NSA à une stimulation lors d'une fréquence basse, due à un phénomène de facilitation de l'ouverture de ce canal (Christel et al. 2012). Enfin, une autre étude dans notre équipe a mis en évidence un lien particulièrement intéressant entre $Ca_v1.3$ et le Ca^{2+} intracellulaire. En effet il s'est avéré que la délétion génétique de $Ca_v1.3$ réduit fortement les libérations locales de Ca^{2+} en condition basale (Figure 28). Ainsi les LCR, qui sont présents dans les cellules des souris WT, à la fin de la phase de dépolarisation diastolique sont également beaucoup moins présentes chez ces souris mutantes. Les canaux $Ca_v1.3$ sont alors présentés comme essentiel à la régulation de la dynamique Ca^{2+} intracellulaire liée à l'activité pacemaker (Torrente et al. 2016).

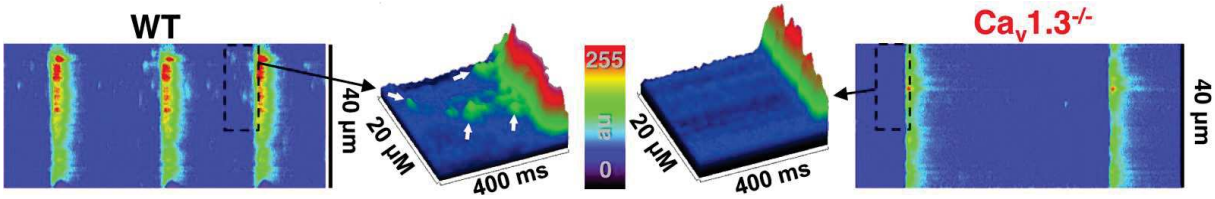


Figure 28: Représentation de « Line-Scan » pris en microscopie confocale qui représente l'activité globale du Ca^{2+} durant les phases de dépolarisation diastolique avec les LCR (flèches blanches) pour les cellules de souris WT, qui sont fortement réduites dans les cellules pacemaker des souris $Ca_v1.3^{-/-}$.

L'émergence de nouveaux concepts sur le rôle des canaux calciques dans l'automatisme

Au vu de l'implication du RyR et du NCX dans l'automatisme cardiaque, ces deux acteurs ne peuvent être écartés comme candidats à la génération de l'automatisme cardiaque. Cependant, il existe maintenant des évidences qui permettent de reconsidérer le rôle des canaux calciques.

Ces évidences viennent principalement des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. En effet d'après le modèle du *calcium clock* c'est le courant engendré par l'activation de l'échangeur NCX qui permettrait à la cellule d'atteindre le potentiel de membrane déclenchant le PA suivant. De plus, on sait que la pente de la dépolarisation diastolique des PA de cellules pacemaker est sensible aux régulations du système adrénergique. Or, l'étude des cellules du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a permis tout d'abord de montrer une forte réduction de l'activité pacemaker, mais également qu'une stimulation adrénergique ne permettait plus d'augmenter la phase exponentielle de la dépolarisation diastolique, contrairement à ce que l'on peut observer avec des cellules de souris WT (Torrente et al. 2016), or c'est précisément lors cette phase de la dépolarisation diastolique que les LCR interviennent sur la fréquence des PA d'après le *calcium clock*.

De plus, il s'est avéré que lorsque le seul courant calcique résiduel de la cellule pacemaker est $Ca_v1.2$, cela ne suffisait pas à engendrer une activité automatique régulière. En effet, les souris $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ présentent une activité pacemaker dérégulée, car en l'absence de ces canaux. Cette activité pacemaker résiduelle est principalement générée par les canaux HCN et prend sa naissance dans des sites du NSA périphérique, voir par des sites extra nodaux. De plus, on y observe également une forte perturbation des LCR sur la phase exponentielle de la dépolarisation diastolique (Baudot et al. 2020). Cela place les deux canaux calciques comme soutien primordial à l'activité calcique impliqué dans le mécanisme du pacemaker.

Le potentiel d'action de la cellule pacemaker

La particularité des cellules pacemaker est de ne pas présenter de potentiel de membrane au repos, mais de présenter une activité spontanée cyclique grâce à la dépolarisation diastolique.

Cet automatisme est le fruit d'une interaction fonctionnelle complexe entre plusieurs classes de canaux ioniques. La phase de montée du potentiel d'action est plus lente que celle des myocytes du myocarde de travail (Verheijck et al. 2001), car la contribution des canaux calciques est en proportion plus importante que celle des canaux sodiques voltage dépendants (Irisawa, Brown and Giles, 1993). Il n'existe pas de consensus quant à l'importance relative des différents canaux ioniques de la membrane plasmatique et de la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire. De ce fait, différents modèles d'automatisme de la cellule pacemaker ont été proposés. Ces modèles mettent l'accent sur le rôle des canaux f-(HCN) (Difrancesco and Severi, 2012), ou bien sur la dynamique du Ca^{2+} (Lyashkov et al. 2018; Maltsev and Lakatta, 2009). Pour notre discussion, nous utiliserons le modèle proposé en 2012 par notre équipe (Christel and Lee, 2012). Ce modèle a été spécifiquement développé pour simuler le cycle pacemaker de la cellule du nœud sinoatrial de souris. Il présente l'avantage d'intégrer les connaissances sur le rôle fonctionnel des canaux $Ca_v1.3$ et I_{st}. Une simulation du cycle pacemaker obtenue avec le modèle de Christel et al., est visible ci-contre (Figure 27).

A la fin d'un PA, le canal HCN4 va s'ouvrir grâce à l'hyperpolarisation de la membrane due au PA précédent, et ainsi le courant I_f s'active et permet le début de la phase de dépolarisation de la membrane. L'activation du courant I_f entraine alors l'ouverture des canaux de type T Cav3.1 portant le courant I_{CaT}, conduisant le potentiel de membrane à -50 mV, atteignant ainsi le potentiel d'activation des canaux de type L $Ca_v1.3$ et du courant I_{st}. A cette nouvelle entrée de calcium, l'échangeur NCX répond en créant un courant sodique entrant pour in fine atteindre le seuil du potentiel d'action, entre -35 et -45 mV. S'en vient ensuite une phase de dépolarisation rapide associé à l'ouverture du canal calcique de type L $Ca_v1.2$, ainsi que du canal Nav1.1.
Puis vient la phase de repolarisation, qui nécessite un courant net sortant. Il est porté par le canal HERG1 qui code pour le courant I_{Kr} qui joue un rôle important durant cette phase (Sanguinetti et al. 1995). Selon l'espèce et la sous-région de nœud sinoatrial où la cellule pacemaker se trouve, en plus du courant I_{Kr}, les courants I_{Ks} et I_{to} peuvent contribuer à la repolarisation (Figure 29).

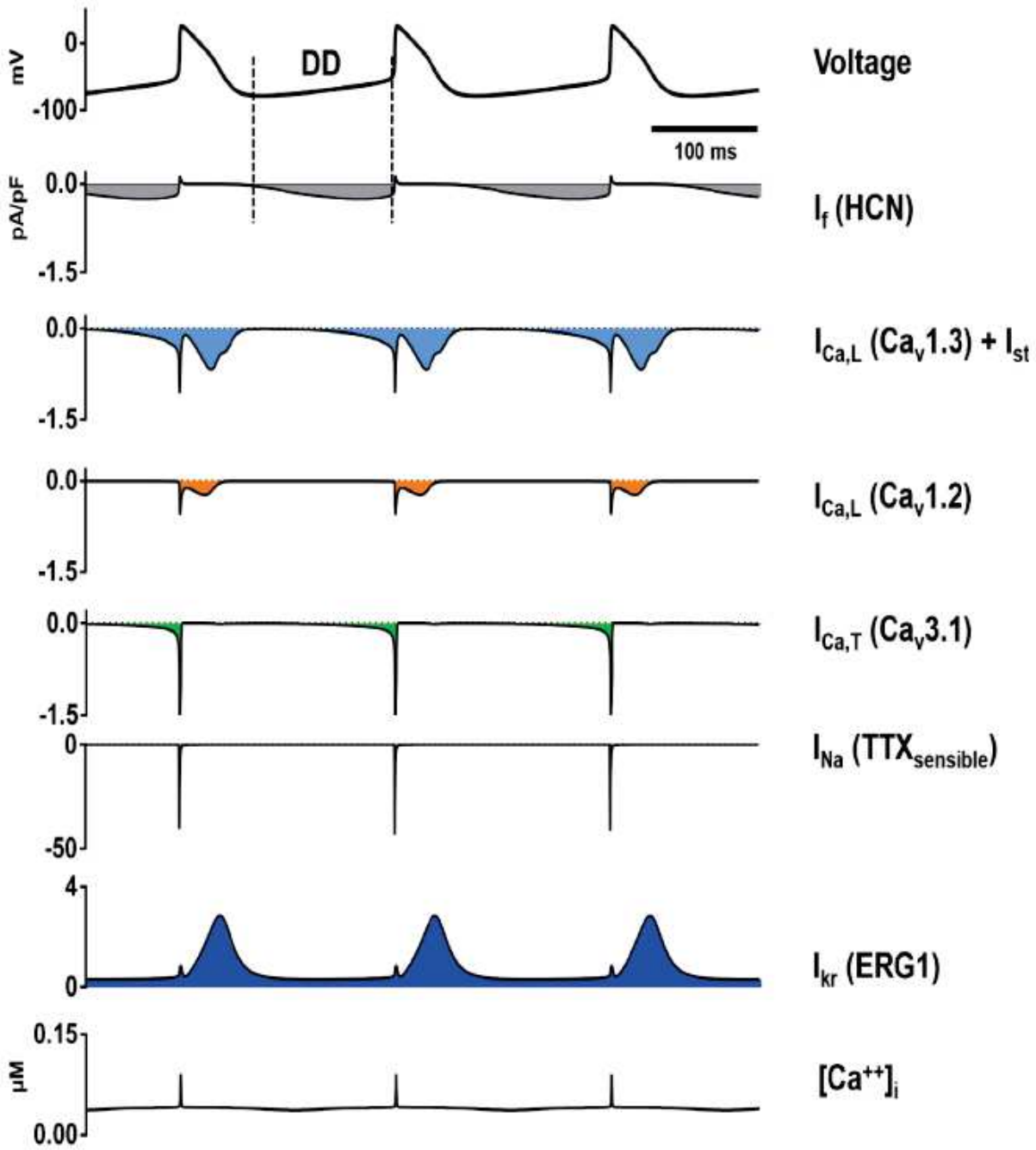


Figure 29: Simulation numérique de l'activité spontanée de la cellule pacemaker de souris avec les courants ioniques contribuant à l'automatisme avec le voltage transmembranaire simulé grâce à un modèle d'automatisme cardiaque chez la souris suivi des ioniques impliqués lors de cet automatisme cardiaque : courant I_f porté par les canaux HCN, courant I_{CaL} porté par les canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$ et le courant I_{st} qui partagent les mêmes bases moléculaires que $Ca_v1.3$, courant I_{CaT} porté par $Ca_v3.1$, le courant I_{Na} porté par les canaux sodiques sensibles à la TTX et le courant I_{Kr} porté par ERG1. D'après Christel et al. 2012

Les voies de régulation de la fréquence cardiaque

Bien que la fréquence cardiaque soit la résultante d'un système complexe permettant l'automatisme, elle peut tout de même être régulée par différents facteurs afin d'ajuster aux besoins de l'organisme. L'un des grands régulateurs de cet automatisme est le Système Nerveux Autonome (SNA). Son rôle est de réguler ou contrôler les fonctions inconscientes de l'organisme telles que, la digestion, la respiration mais également la fréquence cardiaque. Il se compose de deux branches : le système nerveux sympathique (SNS), et le système nerveux parasympathique (SNP) (Figure 30).

Ces deux branches ont des actions opposées :

Le SNS est le mode d'action, ou d'urgence de l'organisme : il va être sollicité lors d'un exercice physique ou d'un danger par exemple, et va permettre à l'organisme de s'adapter. Cela va notamment passer par une augmentation de la fréquence cardiaque afin d'augmenter la disponibilité de l'oxygène et des nutriments aux muscles en travail. Pour envoyer son message, le SNS va agir grâce à deux neurotransmetteurs, l'adrénaline et la noradrénaline, qui peuvent se fixer sur les cellules cibles (Figure 31).

Le SNP lui correspond à un temps de relaxation ou de repos, son action est primordiale afin de permettre à l'organisme de conserver son énergie ou bien encore de réduire la fréquence cardiaque après une stimulation du SNS. Le neurotransmetteur de cette branche du SNA est l'ACh (Figure 31).

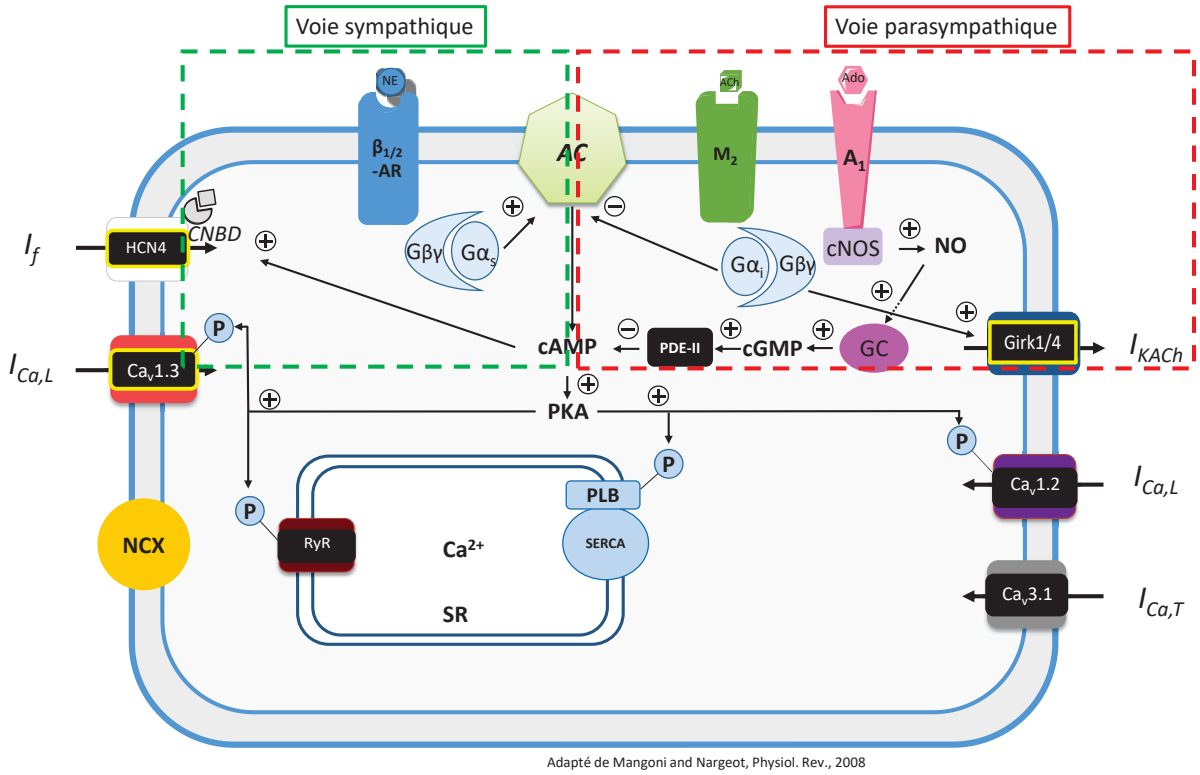


Figure 30: Illustration des voies de signalisation du système nerveux autonome sympathique et parasympathique dans la cellule pacemaker. Daprès Mangoni et Nargeot, 2008.

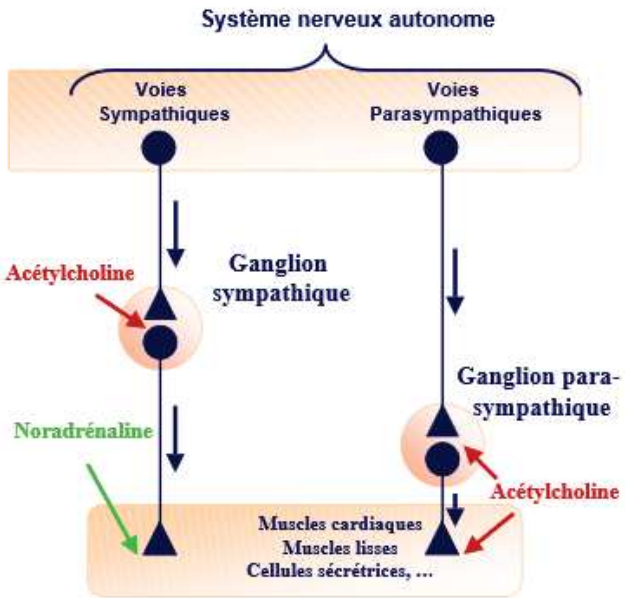


Figure 31: Les voies d'action des neurotransmetteurs du SNA

La voie de régulation sympathique

Les récepteurs β-adrénergiques sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couple à une protéine Gs. Lorsqu'un catécholamine telle que la noradrénaline se fixe au récepteur β sur la cellule pacemaker, la sous-unité α de la protéine Gs va s'associer à l'Adénylate Cyclase (AC), une enzyme transmembranaire, et ainsi activer la production d'AMPc, un second messager capital dans cette voie de signalisation.

Pour induire l'augmentation de la fréquence cardiaque, l'AMPc va avoir un mode d'action direct, comme évoqué précédemment, il se fixe directement sur le domaine CNBD des canaux HCN4 (Figure 32). Cette interaction augmente la probabilité d'ouverture de ces canaux grâce à un déplacement du seuil d'activation à des potentiels plus positifs.

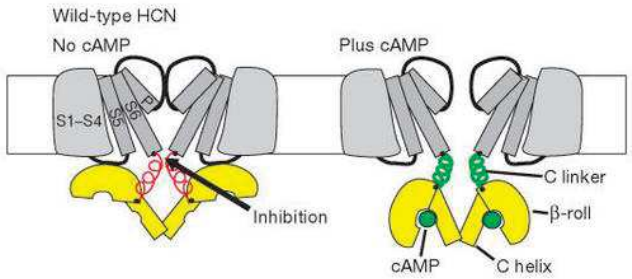


Figure 32: Schématisation de l'ouverture d'un canal HCN en présence d'AMPc. D'après Wainger et al. 2001

Les canaux calciques de type L, dont $Ca_v1.3$ dans la cellule pacemaker peuvent également être stimulés par l'AMPc, en effet sa présence augmente rapidement la probabilité d'ouverture de ces canaux ainsi que leur temps moyens d'ouverture (Sperelakis, 1994). Cet effet est dépendant de l'activité de la protéine kinase A (PKA) et c'est le mode d'action indirect de l'AMPc. En condition basale, la PKA peut se fixer sur les canaux calciques de type L par le biais d'une protéine d'ancrage à la PKA (AKAP pour A-Kinase Anchoring Protein). Cela va permettre la phosphorylation d'un résidu Serine1700. Mais les effets sur le canal seront limité par son domaine C-terminal et parce que l'activité de la PKA ne sera pas stimulée. En condition de

stimulation adrénergique, l'augmentation du taux d'AMPc dans la cellule va venir stimuler l'activité de la PKA, engendrant ainsi une phosphorylation plus importante du canal calcique de type L, un changement de conformation de son domaine C-terminal et ainsi une augmentation de son activité (Figure 33) (Hell, 2010).

Ces voies de signalisation induisent alors une augmentation de la pente de la dépolarisation diastolique du PA sinusal et donc une accélération de la fréquence cardiaque.

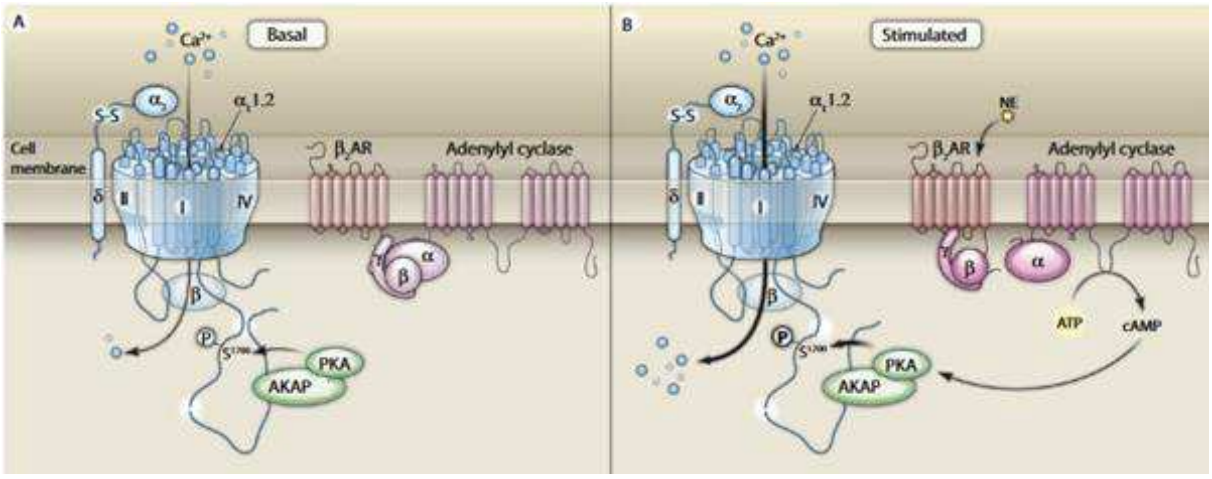


Figure 33: Illustration de la régulation par le SNA sympathique d'un canal calcique de type L ; A : en condition basal ; B : en condition de stimulation du récepteur adrénergique. D'après Hell, 2010.

La voie de régulation parasympathique

La réduction de la fréquence cardiaque par la voie parasympathique est initiée par la fixation de l'ACh sur le récepteur muscarinique M2 et par la fixation de l'Adénosine (Ado) sur le récepteur à l'Adénosine A1, deux récepteurs liés à une même protéine Gi. On peut observer deux modes d'action qui vont avoir cette fois pour objectif, de freiner la fréquence cardiaque :

Le mode d'action le plus direct est liée à la protéine Gi couplés à M2 et A1. En effet lorsque ces ligands se fixent sur leurs récepteurs respectifs, la sous-unité α de la protéine Gi va inhiber la production d'AMPc par l'AC, et les sous-unités βγ vont directement activer les canaux GIRK1/4 (Figure 21) (Krapivinsky et al. 1995a).

Le mode d'action moins direct pour la diminution de la fréquence cardiaque est l'activation d'une voie NOS (oxyde nitrique synthase constitutive). Une NOS constitutive (cNOS) va produire de l'oxyde nitrique (NO) qui va à son tour activer une guanylate cyclase.

Cette activation va permettre d'augmenter le taux intracellulaire de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La GMPc va alors engendre une hydrolyse-phosphodiesterase II (PDE II) dépendante de l'AMPc (Han et al. 1998) (Figure 21). Ce mode d'action joue notamment un rôle important sur l'inhibition du courant I_{CaL} dans le but de diminuer la fréquence cardiaque (X et al. 1995).

Objectifs

L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle des canaux de type L $Ca_v1.3$ dans la régulation cholinergique de l'activité pacemaker des cellules du nœud sinoatrial et de la fréquence cardiaque. Comme nous avons vu dans les sous-chapitres précédents, les canaux $Ca_v1.3$ agissent en concertation avec d'autres canaux ioniques impliqués dans la régulation de l'activité pacemaker par le système nerveux autonome. Le ralentissement de l'activité pacemaker par l'ACh est le résultat de cette interaction fonctionnelle entre ces canaux. Par conséquent, il nous faut étudier le rôle des canaux $Ca_v1.3$ après avoir réduit l'action des autres acteurs principaux, pour mieux isoler la contribution de nos canaux d'intérêt. En tenant compte des études menées au cours de trente dernières années, trois acteurs majeurs sont à considérer et sont discutés ci-dessous.

L'acteur historique : GIRK1/4

Comme décrit précédemment, le canal GIRK1/4 est le canal portant le courant I_{KACh} dont l'activation dépend directement de la liaison des sous-unités βγ de la G protéine avec le canal (Krapivinsky et al. 1995b).

Les souris Girk4$^{-/-}$ (Wickman et al. 1998) ont été généré afin de comprendre le rôle de ce courant. Il a alors été observé que ces souris présentaient une légère augmentation de la fréquence cardiaque de base (Mesirca et al. 2013).

De plus, les cellules pacemaker provenant de ses souris présentent une réponse à l'ACh réduite. Contrairement à des souris WT, l'ACh, par exemple à une dose de 0.01 µM, présente un effet d'environ 36% de la fréquence cardiaque (contre 71% de réduction chez des souris WT) (Figure 34A). Ces mêmes souris, après une stimulation du SN sympathique induite par l'exercice physique, ne récupèrent leur fréquence cardiaque de base que plus lentement que des souris WT (Figure 34 B et C). Ce canal apparait comme important pour la régulation cholinergique de l'activité pacemaker.

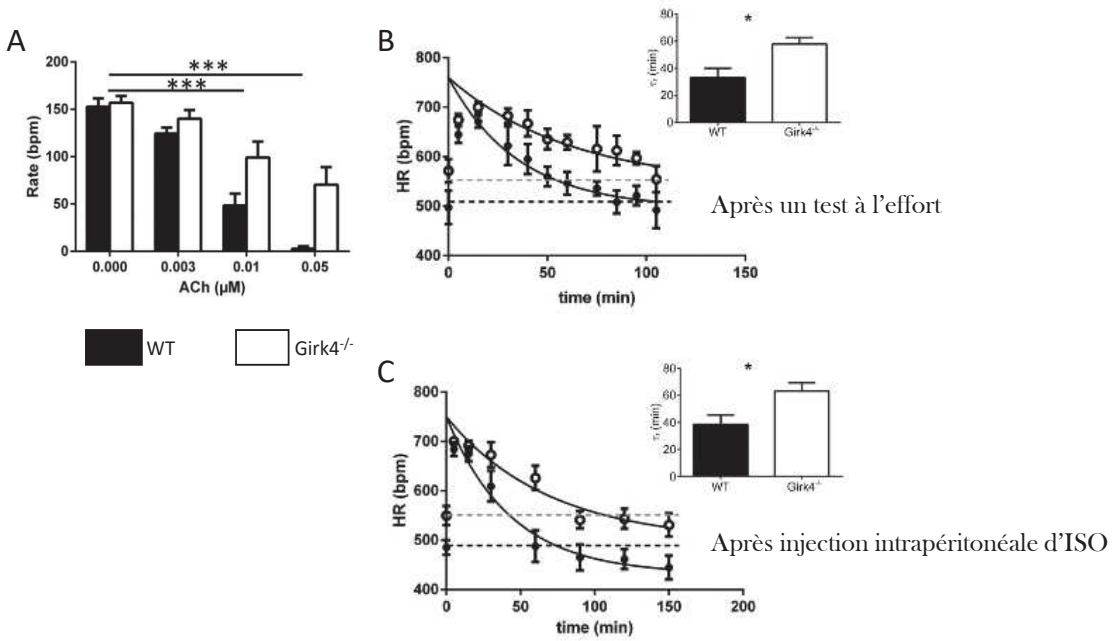


Figure 34: A : Fréquence cardiaque de souris WT et GIRK4-/- en condition contrôle et en présence d'ACh ; B : Visualisation de la récupération après un test à l'effort de la fréquence cardiaque sur souris WT et GIRK4-/- ; C : Visualisation de la récupération après stimulation pharmacologique du SN sympathique de la fréquence cardiaque sur souris WT et GIRK4$^{-/-}$. D'après Mesirca et al. 2013.

L'acteur découvert : HCN4

HCN4, porteur du courant I_f, fut rapidement pressentit comme, lui aussi, un acteur important dans la régulation cholinergique de la fréquence de l'automatisme cardiaque. En effet, son ouverture et sa dépendance au voltage sont influencés par la présence d'AMPc dans la cellule, grâce à son domaine CNBD. Les travaux de DiFrancesco montrent alors que l'ACh diminue le courant I_f, amenant ainsi à la réduction de la fréquence des PA dans les cellules du NSA (Figure 35) (DiFrancesco, 1993; DiFrancesco, 2010).

De plus, il s'est avéré assez tôt que l'ACh n'agissait pas de la même manière sur le courant I_f et sur le courant I_{KACh}. En effet il semblerait que l'effet inhibant de l'ACh sur I_f se laisse observer à des concentrations beaucoup plus faibles que les concentrations d'ACh nécessaire à l'activation du courant I_{KACh}. Cela signifierai qu'une faible dose d'ACh permettrait la réduction de la fréquence cardiaque par l'inhibition du courant I_f, alors que de forte dose d'ACh seront

necessaires pour abaisser fortement la fréquence cardiaque par l'activation du courant I_{KACh} (DiFrancesco et al. 1989).

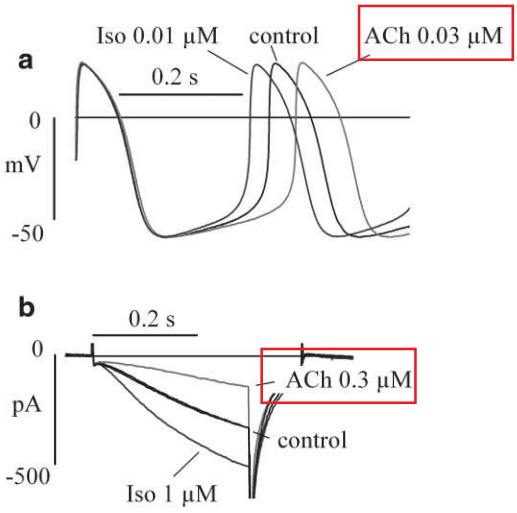


Figure 35: a : Réduction de la fréquence des potentiels d'action en présence d'ACh ; b : Réduction du courant I_f en présence d'ACh D'après DiFrancesco, 1993, 2010.

Un nouvel acteur potentiel à découvrir : $Ca_V1.3$

Dès 1993, il est apparu qu'un courant calcique de type L était modulé par la présence de l'ACh sans stimulation préalable du SN sympathique (Petit-Jacques et al. 1993) (Figure 36).

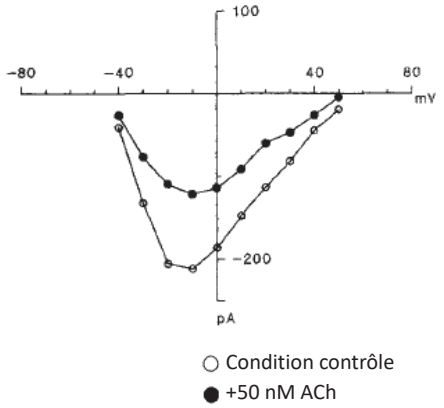


Figure 36: Diminution de la densité du courant calcique de type L dans les cellules du NSA de lapin. D'après Petit-Jacques et al. 1993

Quelques années plus tard, des études ont permis d'observer un courant calcique de type L sensible à l'ACh et à l'ISO, les deux neurotransmetteurs de voies du SNS et du SNP dans la régulation de l'automatisme (Han et al. 1994; Zaza et al. 1996) (Figure 37 et 38).

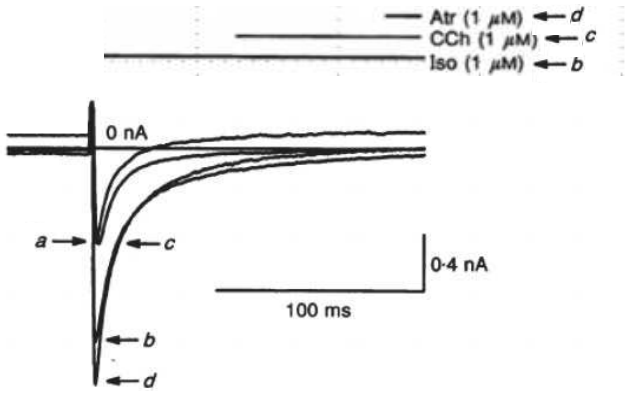


Figure 37: Réponse du courant I_{CaL} en présence des neurotransmetteurs des système nerveux sympathique et parasympathique. D'après Han et al. 1994

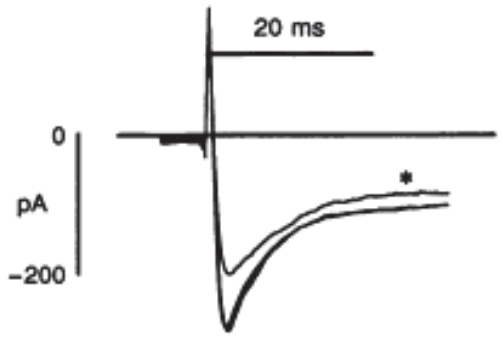


Figure 38: Inhibition du courant I_{CaL} en présence d'ACh. D'après Zaza et al. 1996

De plus, lors d'une étude concernant la contribution de l'activité calcique intracellulaire sur la réduction de l'activité pacemaker par une stimulation cholinergique, il s'est avéré que lorsque que le courant I_f et le courant I_{KACh} étaient inhibé (respectivement par de l'ivabradine et de la tertiapine) et en présence d'ACh, la réduction de l'activité était encore de 72%. Il s'avère également que l'inhibition des RyR permettait de faciliter cette réduction (Van Borren et al. 2010). Le lien étroit entre le RyR et $Ca_v1.3$ laisser entendre que le canal calcique peut être la clé de ce mécanisme.

Pour les raisons évoquées précédemment concernant son implication dans l'activité pacemaker, $Ca_v1.3$ semble donc être le candidat idéal pour être à l'origine de ce courant calcique de type L sensible à l'ACh.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est donc de déterminer le rôle de GIRK1/4, HCN4 et $Ca_v1.3$ dans la régulation cholinergique de la fréquence cardiaque dans la cellule pacemaker.

Matériels et Méthodes

Les animaux

Cette étude a été menée conformément aux directives Européennes (2010/63/EU) et approuvée par le Ministère Français de l'Agriculture (Decret D34-172-13). L'utilisation des souris est soumise à une saisine à partir du moment où la douleur infligée est supérieure ou égale à une piqure d'une aiguille. Cette saisine est soumise à l'approbation de la structure du bien-être animal, d'un comité d'éthique ainsi que du Ministère de L'agriculture.

Tous les animaux utilisés lors de cette étude sont des souris de fond génétique C57BL/6J. Toutes ces souris naissent et évoluent au sein du plateau iexplore sur le site de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (statut sanitaire EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique) de Montpellier ou au PCEA (Plateau Central d'Elevage et d'Archivage), (statut sanitaire SOPF : Specific and Opportunistic Pathogen Free), une zone de production centrale au statut sanitaire sans pathogènes spécifiques ou opportunistes. Ces deux structures appartiennent au Réseau des Animaleries de Montpellier, faisant partie de l'UMS (unité mixte de service) Biocampus.

Les souris évoluent dans un environnement à température constante (21°C) et sous éclairage contrôlé avec un cycle jour/nuit de 12h. Elles ont accès ad libitum à l'eau et à une nourriture adaptée à leur besoin.

Pour cette étude, des souris des deux sexes et âgées d'au moins 8 semaines ont été utilisées.

Les souris Wild Type

Les souris type sauvage ou Wild Type (WT) proviennent de la société Charles River ou Janvier Labs

Les souris HCN4-CNBD :

Ces souris présentent un canal HCN4 présent et fonctionnel mais tronqué. En effet chez ces souris, la substitution du résidu en position 573 en un codon stop induit la délétion du domaine CNBD (Cyclic nucleotid binding protein ou proteine de liaison au nucléotide cyclique) qui est le site de liaison de l'AMPc sur le canal HCN4. Cette construction génétique a été possible par l'identification de cette mutation chez l'Homme (Alig et al. 2009).

Chez une souris WT, on peut observer que le courant I_f porté par le canal HCN4 augmente en présente d'ISO. Chez les souris HCN4-CNBD, en condition contrôle le courant I_f est comparable à celui des souris WT, mais n'augmente plus en présence d'ISO (Figure 39 A). Lorsque l'on étudie la densité de ce courant I_f, le même constat peut être fait : dans les cellules pacemaker d'une souris WT la densité du courant I_f augmente en présence d'ISO, dans les cellules pacemaker d'une souris HCN4-CNBD, la densité du courant I_f en condition contrôle est semblable à celle des cellules de souris WT, mais sa densité n'augmente pas en présence d'ISO (Figure 39 B).

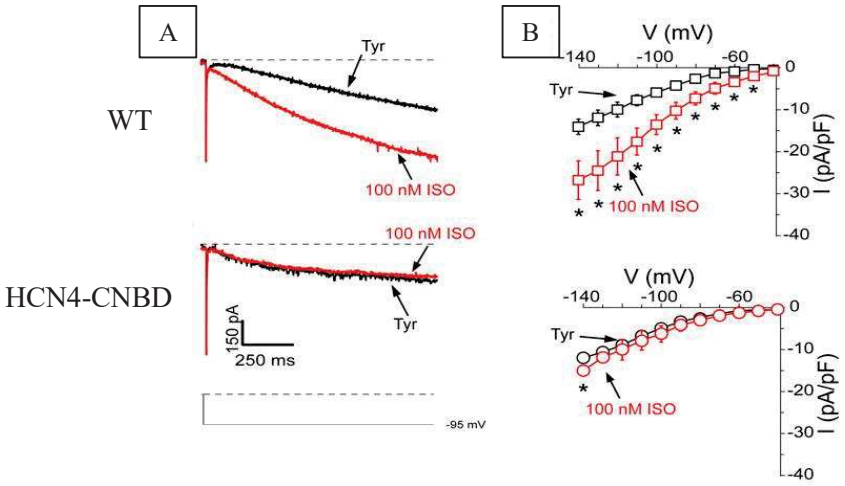


Figure 39: Le courant If porté par le canal HCN4 en condition contrôle (noir) et en présence d'isoprénaline (en rouge) chez les souris WT et les souris HCN4-CNBD. A : Exemple de tracé du courant If. B : Courbe de densité du courant en fonction du voltage. D'après Alig et al. 2009

Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$

Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ ont été générées en 2000 dans l'équipe de Jörg Striessnig (Institut de pharmacologie d'Innsbruck, Autriche).

Lorsque l'on compare le courant calcique de type L dans des cellules pacemaker de souris WT et de souris $Ca_v1.3^{-/-}$, on observe une très forte diminution de ce courant dans les cellules du NSA des souris KO pour $Ca_v1.3$ (Figure 40 A et B). Lorsque l'on veut étudier la densité de ce courant dans ces mêmes cellules, on remarque une densité drastiquement plus faible dans les cellules du NSA des souris KO.

D'un point de vue du phénotype de ces souris, elles présentent un fort ralentissement de l'automatisme cardiaque ainsi qu'une bradycardie importante (Mangoni et al. 2003).

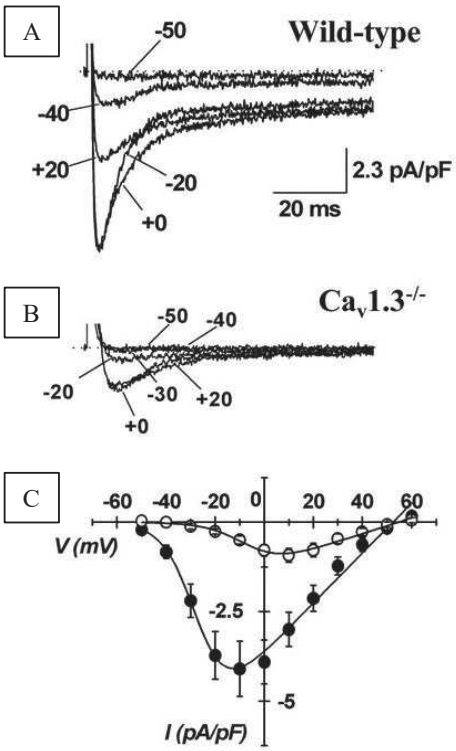


Figure 40: Le courant I_{CaL} dans les cellules du NSA sur lesquelles on applique un protocole d'étape de plusieurs voltages dépolarisant. A : sur cellules de souris WT. B : et souris $Ca_v1.3$-/-. C : Courbe I-V du courant I_{CaL} dans des cellules du NSA de souris WT (cercles pleins) et $Ca_v1.3$-/- (cercles vides). D'après Mangoni et al. 2003.

Les souris GIRK4$^{-/-}$

Les souris GIRK4$^{-/-}$ ont été généré par le laboratoire du Docteur Kevin Wickman afin d'étudier la contribution de I_{KACh} dans la régulation de la fréquence cardiaque (Wickman et al. 1998). Le canal GIRK1/4 est un hétérodimère, en effet GIRK1 seul ne peut générer le courant I_{KACh} (Krapivinsky et al. 1995c), l'ablation génétique de GIRK4 permet ainsi d'obtenir des souris ne présentant pas ce courant (Figure 41) (Mesirca et al. 2013). Ces souris ont permis de déterminer que GIRK1/4 contribuait à hauteur de 50% de l'effet chronotrope négatif des effets d'une stimulation de la voie muscarinique et adénosine.

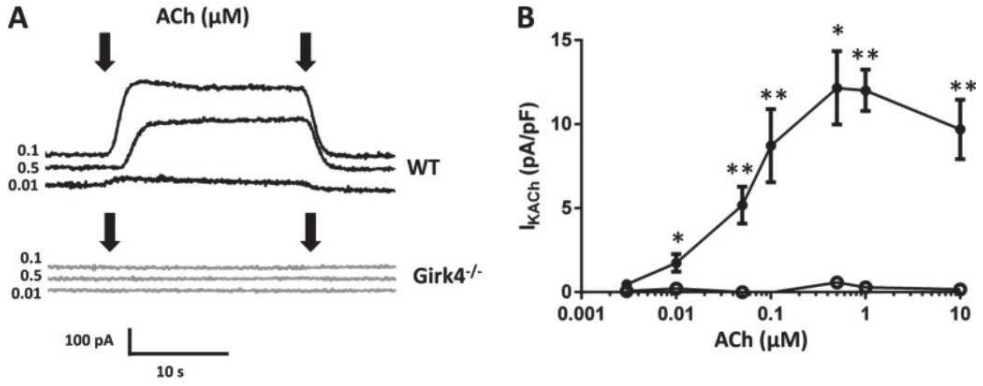


Figure 41: A : Exemple de tracé du courant IKACh en présence d'ACh dans des cellules de souris WT et GIRK4-/-. B : Densité du courant IKACh à différentes concentration d'ACh dans des cellules pacemaker de souris WT (cercles pleins) et GIRK4-/- (cercles vides). D'après Mesirca et al. 2013.

Les doubles mutants HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ et Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$

Pour cette étude, les souris HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ ainsi que les souris Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ ont été utilisées afin d'étudier au mieux la relation de chacun de ces acteurs en lien avec la problématique. En effet l'objectif de cette étude est de déterminer le rôle différentiel des canaux GIRK1/4, HCN4 et Ca$_v$1.3 dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque. Ces doubles mutants vont alors permettre d'étudier l'influence de chacun de ces canaux dans cette régulation lorsque que les deux autres ne peuvent agir.

Les souris HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$

Les souris doubles mutantes HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ ont été croisées à l'origine dans le laboratoire du Docteur Dirk Isbrandt. Dans cette étude, ces souris permettent d'étudier le rôle de Ca$_v$1.3 dans la régulation cholinergique de l'automatisme cardiaque en l'absence du courant I_{KACh} et de l'ouverture sensible de HCN4 à l'AMPc.

Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$

Ces souris ont été générées au sein du laboratoire en croisant les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et GIRK4$^{-/-}$ (Mesirca et al. 2016a). Ces souris ont été utilisées afin de déterminer le rôle de l'ouverture AMPc-dépendante de HCN4 lors d'une régulation cholinergique de l'activité pacemaker lorsque GIRK1/4 et $Ca_v1.3$ sont absents.

Méthode d'anesthésie

Pour l'ensemble des expériences *ex vivo* (Langendorff et Optical Mapping) et *in vitro* (Microscopie confocale et Patch-Clamp), les protocoles d'anesthésie de la souris et du prélèvement cardiaque sont similaires. L'anesthésie débute par une injection intra-péritonéale (IP) d'un mélange de 0.01 mg/g de Xylazine (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen Germany) et de 0.1 mg/g de Kétamine (Imalgène, Merial, Bourgelat France). Lorsque la souris est anesthésiée, une injection d'héparine (250 U/souris de 30 gr) (Héparine choay, Sanofi-Aventis France) est pratiquée en IP afin d'éviter la formation de caillots dans le réseau coronaire au cours du prélèvement du cœur. Pour terminer, la souris est euthanasiée avec une injection IP de pentobarbital sodique (1.8 mg/30 gr) (Euthasol vet - TVM).

Chacune de ces solutions est préparée dans une solution physiologique (Chlorure de Sodium Lavoisier 0,9%). Les solutions sont chauffées au bain marie à 37°C avant leur utilisation.

La dissection peut commencer lorsque l'on a vérifié que les réflexes podal et caudale sont abolit.

Prélèvement du cœur

Avant l'anesthésie de la souris, une solution de Krebs-Henseleit (en grammes : 6.78 de NaCl, 0.7 de KCl, 0.271 de MgSO4, 0.04 de NaH2PO4, 2.27 de NaHCO3, 1.8 de Glucose, 1.8 de CaCl2) a été préparée et conservée à 4°C.

Après l'anesthésie, la souris est placée sur le dos et fixée au niveau de ses membres inférieurs et supérieurs afin de dégager la zone thoracique. La peau est coupée sous le sternum de l'intérieur vers l'extérieur en longeant les côtes. La découpe se poursuit de chaque côté de la cage thoracique jusqu'à la naissance de chaque patte avant. Le diaphragme est ensuite découpé en prenant soin de tenir les ciseaux le plus loin possible du cœur afin d'être sûr de ne pas

l'endommager. Puis les côtes sous enfin découpées de bas en haut de chaque côté afin de rendre visible le système cardio-respiratoire.

Le thymus ainsi que les lobes pulmonaires sont éliminés, puis à l'aide d'une pince courbée afin encore une fois de ne pas l'endommager, le cœur est retiré de la cage thoracique en coupant l'aorte au niveau de la crosse aortique.

Le cœur est alors délicatement placé dans un bain de tampon physiologique hépariné (0.5 ml d'héparine pour 50 ml de tampon) et à 4°C.

Méthode de cœur isolé perfusé ou Langendorff

La méthode de Langendorff ou de cœur isolé perfusé a été mise au point et décrite en 1895…(Langendorff, 1895). La base de cette technique est la perfusion d'un cœur (à l'origine, de mammifère) pour lui apporter l'oxygénation et les éléments nutritifs pour avoir un fonctionnement au plus près d'une condition physiologique tout en enregistrant des paramètres tels que la contraction ou bien encore la régulation du flux coronarien.

Cette méthode d'expérimentation *ex vivo* est une technique permettant d'étudier l'électrocardiogramme (ECG) murin sur cœur entier tout en s'affranchissant du système nerveux autonome.

Montage du cœur sur le système

Après le prélèvement du cœur, une canule en métal de 0.8 mm de diamètre, qui a été préalablement rempli de Krebs afin d'éviter la présence de bulles d'air, est insérée dans l'aorte puis ligaturé avec du fil de suture en soie non résorbable 5.0 (Fine Science Tools). La canulation se fait sous une loupe binoculaire pour plus de précision.

La canule est ensuite montée sur le système de cœur isolé (Figure 42) (EMKA technologies) dont le système de perfusion a été en amont rempli par la solution de Krebs-Henseleit oxygénée au carbogène (Oxygène 95% Dioxyde de carbone 5%) 15 minutes avant la canulation et qui continuera à l'être tout le long de l'expérimentation. La perfusion se fait de façon rétrograde, c'est-à-dire dans le sens inverse du sang *in vivo*.

Grâce à un capteur de pression placé près du cœur, le régulateur flux/pression, lui-même connecté à une pompe péristaltique, permet de garder une perfusion à 70 mmHg qui correspond à un volume de 2 à 5 ml/min de Krebs en fonction du cœur lui-même.

La température est contrôlée et reste à une valeur constante de 37°C grâce à des cuves chauffées tout autour du cœur et par un système de condenseur en serpentin qui chauffe la solution de Krebs avant qu'elle n'arrive au cœur. Ces deux systèmes de chauffages sont gérés par deux bains-marie que l'on peut contrôler.

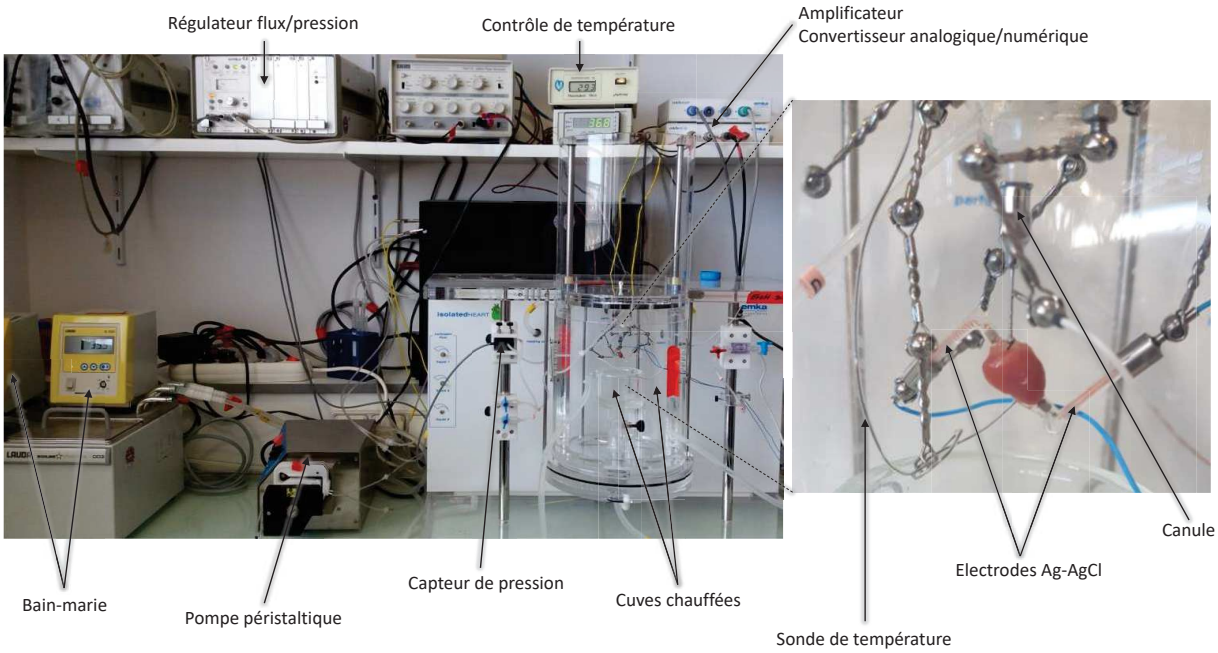


Figure 42: Composition du système de perfusion d'un cœur isolé perfusé comprenant un système de chauffe, un système de régulation de la pression (senseur de pression et pompe péristaltique connectés) ainsi que des électrodes.

Lorsque ces paramètres sont maitrisés, on laisse le cœur se stabiliser 15 minutes avant le début de l'acquisition. Puis des électrodes Ag-AgCl sont placées au niveau de l'oreillette droite, près de sinus atrio-ventriculaire, et au niveau de l'apex, l'équivalent de la dérivation D2 chez l'Homme. Elles sont directement reliées à un amplificateur et convertisseur analogique/numérique qui permettent la lecture des données de l'ECG sur un logiciel.

Solutions perfusées

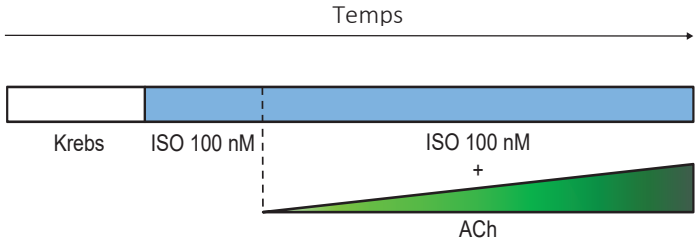
La solution physiologique utilisé est le Krebs-Henseleit, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

La stimulation β-adrénergique est induite par l'ISO (Isoprénaline Hydrochloride, Sigma-Aldrich) à une concentration de 100 nM.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à des concentration de 1 et 3 µM.

Protocole de perfusion des solutions

Pour cette expérimentation, un protocole d'antagonisme accentué a été choisi. Après une condition contrôle, l'ISO est perfusé. Puis, des doses croissantes d'ACh sont ajoutées à la perfusion.



Analyse

L'ECG est une technique permettant de visualiser et d'enregistrer l'activité électrique cardiaque sous forme d'onde (Figure 43), permettant ainsi l'étude de différents paramètres.

En effet, chaque onde correspond à un moment clé de la contraction cardiaque :

-L'onde P correspond à la dépolarisation auriculaire, pendant cette phase, les oreillettes vont enchainer la fin de la phase diastolique, et le début de la phase systolique. C'est sur la dérivation DII qu'elle est la plus visible.

-L'intervalle P-R indique la conduction auriculo-ventriculaire. La dépolarisation va alors atteindre le NAV, puis le faisceau de His puis les fibres de Purkinje

-Le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules, il présente une amplitude bien plus importante que l'onde P de par le volume des ventricules en comparaison avec celui des oreillettes. Ce complexe correspond au changement de phase diastolique à systolique pour les ventricules. La déflexion de la phase systolique des oreillettes sera cachée par ce complexe.

-L'onde T correspond à la fin de la systole ventriculaire et donc à leur repolarisation.

-L'onde U est la dernière déflexion qui peut être observée après le complexe QRS et qui correspond à la repolarisation des fibres de Purkinje.

Les analyses des EGC *ex vivo* des cœurs se font grâce au logiciel ecgAUTO v3.3.5.12 (EMKA technologies).

Cela permet de compter les ondes P et le pic R du complexe QRS afin de calculer la fréquence atriale et ventriculaire lors de l'expérience.

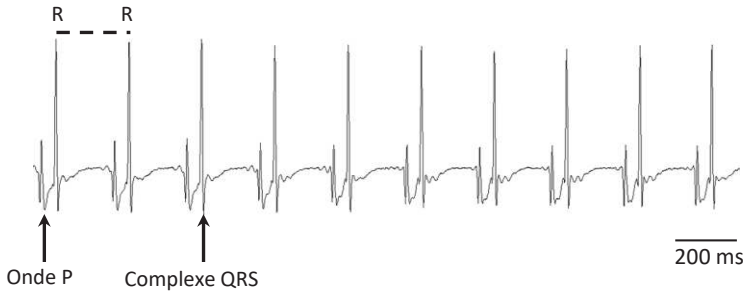


Figure 43: Exemple de tracé d'EGC ex vivo

Cartographie optique

La cartographie cardiaque a été décrite pour la 1ere fois en 1915 (Lewis et al. 1915). Cette technique a atteint une avancée technologique suffisante pour pouvoir étudier l'activité électrique d'un nœud sino-atrial intact. Cette technique nous permet ainsi d'étudier et d'analyser différents paramètres électrophysiologiques de cette zone tout en continuant de prendre en compte son environnement tissulaire direct.

Préparation du tissu

Pour la préparation du tissu sinusal, le cœur est prélevé selon la même technique utilisée pour les expérimentations de Langendorff mais en prenant soin cette fois ci de couper les veines caves, supérieure et inférieure, le plus loin possible du cœur. Le cœur est ensuite placé dans une boite qui possède un fond en Silgard (Silicone elastomer kit – World Precision Instruments, Inc) sous une loupe binoculaire. On utilise ici du Tyrode (140.0mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl2, 1.0 mM, MgCl2, 5.0 mM Hepes-NaOH, et 5.5 mM D-glucose, ajusté à un pH de 7.4 avec du NaOH) car le bain ne sera pas oxygéné. Le tyrode est préalablement réchauffé à 37°C.

Le cœur est placé partie dorsale vers l'avant. Il est épinglé à l'aide d'aiguilles sur la partie ventriculaire afin de ne pas endommager la zone atriale. L'isolement du tissu sinusal débute par une incision entre les deux oreillettes et les ventricules, les cavités sont rincées grâce à une injection légère de Tyrode. Puis les oreillettes sont entièrement séparées en faisant une coupe sur toute la circonférence du cœur.

La partie atriale va alors être fixée, oreillette droite à gauche de l'expérimentateur, et l'épicarde sur le fond de la boite. Les veines caves supérieure et inférieure sont coupées longitudinalement afin de les conserver tout en voulant obtenir la surface la plus plane possible pour l'acquisition.

Traitement du tissu sinusal pour l'acquisition

Le tissu est alors placé dans une solution de Di-4-ANEPPS de 6 µM (Interchim®, France), une sonde moléculaire dont la fluorescence change en fonction des variations du voltage, diluée dans du Tyrode. La préparation est placée 45 minutes, à l'obscurité, à température ambiante afin d'obtenir un marquage homogène. Le tissu est ensuite rincé au Tyrode pour éviter le bruit de fond et la toxicité de la sonde.

Acquisition

Pour une acquisition plus nette et pour éviter les bruits de fond, toutes les solutions testées sont mélangées avec de la Blebbistatine à 10 µM (Selleck Chemicals). La blebbistatine est un inhibiteur spécifique de la myosine II, ce qui va permettre d'inhiber la contraction du tissu.

Avant l'acquisition, le tissu est placé dans une chambre chauffante adaptée et va être perfusé au Tyrode passant par un stylo de perfusion chauffant. Une période de 10-15 minutes sera nécessaire pour que la blebbistatine agisse et pour que le tissu soit dans un environnement à 37°C.

Solutions utilisées

La solution physiologique utilisé est le Tyrode, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à des concentration de 1 et 10 µM.

Analyses

Le logiciel BrainVision permet d'observer la propagation du signal électrique sur tout le tissu, du site d'initiation principal normalement positionné sur le nœud sino-atrial, jusqu'au bout des oreillettes droite et gauche (Figure 44).

Cette activité électrique peut être analysée par pixel, à un temps choisi. Grâce au logiciel Clampfit (10.7, Molecular devices Inc.), on peut alors analyser différents paramètres comme la fréquence de dépolarisation du tissu intact ou bien encore la localisation du site d'initiation de l'automatisme cardiaque (Figure 45).

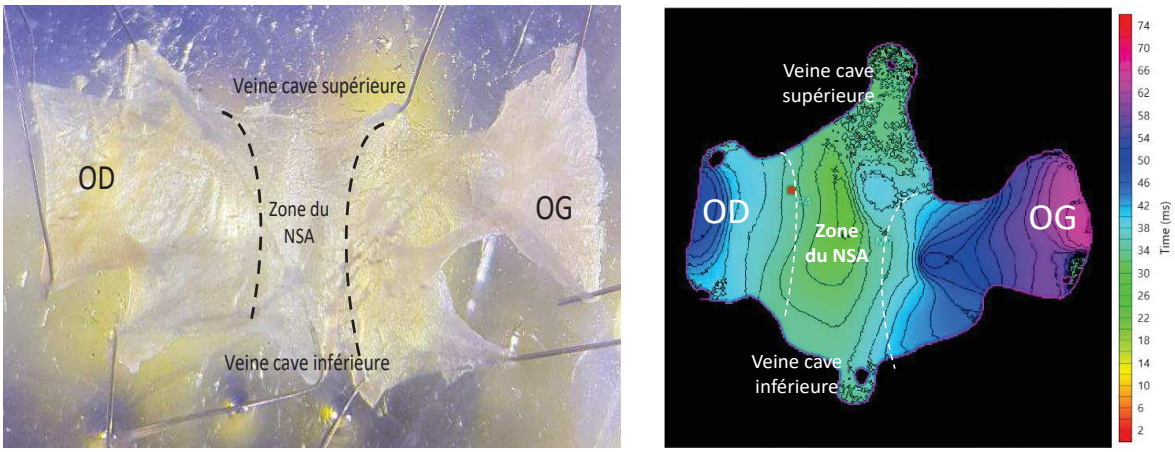


Figure 44: Préparation du tissu sinusal. A droite : photo de la préparation et marquage des zones d'interêts. A gauche : carte d'activation et conduction de la depolarisation sur le tissu

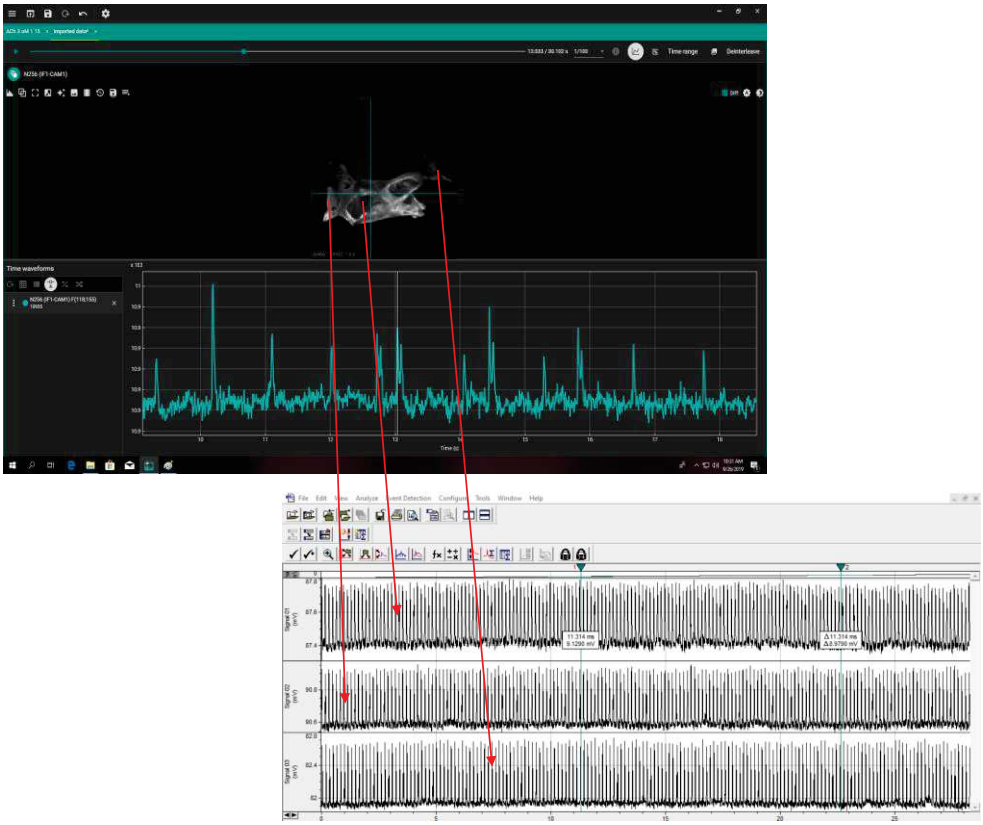


Figure 45: Exemple de tracé analysé de cartographie optique

Microscopie Confocale

La microscopie confocale est une technique d'imagerie permettent d'observer et d'étudier la dynamique calcique intracellulaire.

Obtention des cellules du sinus atrio-ventriculaire isolées

L'obtention des cellules sinusales isolées commence par l'extraction du tissu sinusal, comme décrit pour la cartographie optique. A partir de ce tissu, l'oreillette droite va être découpée au niveau de la crista terminalis (CT) et l'oreillette gauche au niveau du septum inter-auriculaire. La partie centrale de ce découpage va contenir le nœud sino-atrial. Trois légères incisions vont être effectuées sur la longueur de ce tissu sans le découper entièrement afin de faciliter les étapes suivantes.

Le tissu va alors être incubés 3 fois dans 2,5 ml de Tyrode à 37°C dans une solution de « Low Ca^{2+} » (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM MgCl2, 0.2 mM CaCl2, 1.2 mM KH2PO4, 50 mM taurine, 5.5 mM D-glucose, 1 mg/ml BSA, et 5 mM Hepes-NaOH (ajustée à pH 6.9 avec du NaOH)) pendant 2,5 minutes.

Le 3eme tube de Low Ca^{2+} contient également 1.2 mg d'élastase (Worthington) et 0.375 mg de libérase TH (Liberase TH Research Grade, ROCHE). Cette étape va durer entre 10 et 20 minutes en fonction du tissu, de son aspect, de sa taille, et de l'âge de la souris. Le tissu sera légèrement agité lors de cette étape pour homogénéiser la solution. La digestion est arrêtée lorsque l'on voit que le tissu perd en structure. La température de 37°C est nécessaire pour l'action des enzymes.

Les quatre prochaines étapes se font dans 4 fois 2,5 ml de Solution « Kraftbrühe » (KB) (70 mM L-glutamic acid, 20 mM KCl, 80 mM KOH, 10 mM KH2PO4, 10 mM taurine, 1 mg/ml BSA, and 10 mM Hepes-KOH (ajusté à pH 7.2 avec du KOH)) toujours à 37°C. Cela permet de stopper la digestion enzymatique. Le tissu restera moins de temps dans la première solution de KB : 2 minutes. Puis un temps d'incubation de 4 minutes est appliqué pour chacun des trois tubes restants.

Le tissu va alors rester dans le 4eme tube de « KB » puis les cellules vont être dissociées mécaniquement, à la main, et de façon attentive, le geste doit être mesuré pour ne pas faire cette étape de façon trop lente ou trop rapide, tout en évitant de faire des bulles, ce qui fragiliserait les cellules isolées.

Pour alors réadapter les cellules à un milieu extracellulaire avec des concentrations de sodium et de calcium physiologiques, une réadaptation progressive est effectuée à des intervalles de temps de 7 minutes, 35, 40 puis 8 fois 80 µl de solution de réadaptation (NaCl 10 mM, CaCl2 1.8 mM). Pour ensuite, 2 fois 200 et 2 fois 625 µl de solution de Tyrode contenant de la BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) à 1 mg/ml.

Préparation des cellules

Après 40 minutes d'attente afin que les cellules récupèrent de la réadaptation calcique, elles sont déposées dans des Fluorodish (FD35-100, World Precision Instruments) tapissées de Laminine (1 mg/ml, 60 µl pour 6 ml, L2020, Sigma-Aldrich). La laminine y a été déposée au

minimum 4 h avant, à 37°C pour une meilleure adhérence puis rincée. Puis les cellules sont réparties délicatement et de façon égale sur les boites et sont laissées au repos pour 1 heure.

Afin de pouvoir poursuivre avec l'acquisition, les cellules sont marquées aux CAL520 (2 µl d'une solution à 1 µg/µl dans 2 ml de Tyrode, AAT Bioquest®, USA), un fluorochrome sensible au calcium, puis rincées délicatement 20 à 30 minutes après.

Acquisition

L'acquisition s'effectue grâce à un microscope confocal à balayage laser ZEISS LSM780 de la plateforme MRI (Plateforme Régionale d'Imagerie du Languedoc-Roussillon ; Biocampus) situé à l'Institut de Génétique Humaine de Montpellier.

Les cellules sont alors perfusées avec les solutions choisies via un stylo de perfusion chauffant (MPRE8 - Cell MicroControls) à 37°C sous un objectif x63 en immersion dans l'huile. Les longueurs d'excitation (493 nm) et d'émission (515 nm) sont choisies en fonction du CAL520.

Le laser scanne une ligne choisie sur la cellule isolée à une vitesse de balayage de 10000 pendant 37.8 secondes, majoritairement utilisée pour l'étude des transitoires calciques, ou 15.3 secondes, pour une étude plus poussée sur les libérations locales de calcium.

Solutions utilisées

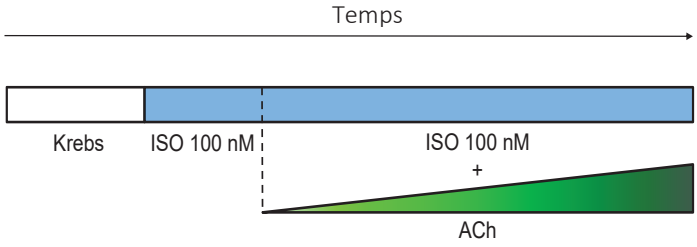
La solution physiologique utilisé est le Tyrode, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

La stimulation β-adrénergique est induite par l'ISO (Isoprénaline Hydrochloride, Sigma-Aldrich) à une concentration de 100 nM.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à une concentration de 50 nM.

Protocole de perfusion des solutions

Pour cette expérimentation, un protocole d'antagonisme accentué a été choisi. Après une condition contrôle, l'ISO est perfusé. Puis, des doses croissantes d'ACh sont ajoutés à la perfusion.



Analyse

Les images recueillies sont d'abord traitées sur le logiciel ImageJ cela permet de réduire le bruit de fond (étape nécessaire pour comptabiliser les libérations locales de calcium), et d'obtenir l'intégrale du signal fluorescent sur la zone choisie de la cellule isolée.

Une fois l'intégrale obtenue, le logiciel Clampfit (10.7, Molecular Devices) permet d'étudier des paramètres tel que la fréquence des transitoires calciques, la fréquence de libération locales de calcium (Figure 46).

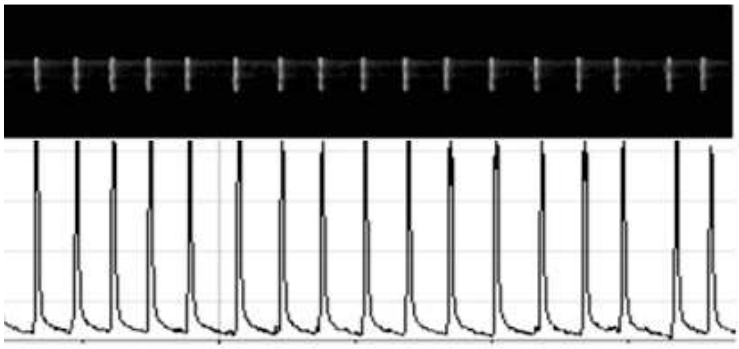


Figure 46: Exemple de tracé de transitoire calcique et son intégrale

Patch Clamp

La technique de patch-clamp permet d'étudier les variations de potentiels transmembranaires des cellules isolées du nœud sino-atrial.

Isolation des cellules

La technique est la même que celle utilisée pour la microscopie confocale.

Préparation des cellules

Pour une meilleure stabilité cellulaire, les cellules sont placées dans un contenant en plexiglas avec fond en verre pour une meilleure adhérence, et ceci, 40 minutes avant le début de l'acquisition. Les cellules sont ensuite perfusées avec du Tyrode à 37°C avec un stylo de perfusion chauffant (MPRE8 - Cell MicroControls).

Acquisition

Une pipette en verre de borosilicate creuses avec filament (Sutter instrument CO., USA) sont étirées pour obtenir un diamètre de 5 à 7 µm à la pointe (résistance de 3 à 5 MΩ). On les approche, à l'aide d'un micromanipulateur à la surface de la cellule, jusqu'à obtenir une jonction de l'ordre du GigaOhm entre elle et la membrane de la cellule. C'est ce qu'on appelle le « Gigaseal »
Ces pipettes contiennent une première électrode d'enregistrement qui baigne dans une solution intracellulaire choisie en fonction de la configuration de patch.

Une fois le « Gigaseal » obtenu, la βescin va alors perforer uniquement la partie de la membrane qui se trouve sous la pipette. Cela permet d'enregistrer une activité transmembranaire, tout en pouvant appliquer des protocoles longs, car la membrane de la cellule sera moins fragilisée que la configuration « whole cell » où la partie membrane sous la pipette est arrachée.

Current Clamp

La configuration « current clamp » en patch-clamp permet de maintenir le courant membranaire des cellules du NSA à une valeur fixe, cela va permettre d'enregistrer des variations de potentiel de membrane.

Solutions utilisées

La solution physiologique utilisé est le Tyrode, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

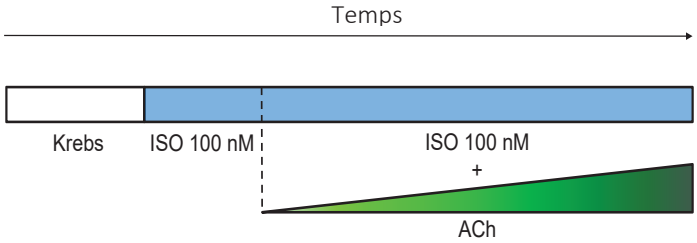
La stimulation β-adrénergique est induite par l'ISO (Isoprénaline Hydrochloride, Sigma-Aldrich) à une concentration de 100 nM.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à des concentrations de 50 nM et 1 µM.

La solution intracellulaire contient : 130.0 mM K^+-aspartate ; 10.0 mM NaCl ; 2.0 mM ATP-Na^+ salt, 6.6 mM créatine phosphate, 0.1 mM GTP-Mg2+, 0.04 mM CaCl2 (pCa = 7.0), et 10.0 mM HEPES-KOH (ajusté à pH 7.2 avec du KOH). De la βescin à 30µM a été ajouté à ce milieu (Escin, Sigma-Adlrich).

Protocole de perfusion des solutions :

Pour cette expérimentation, un protocole d'antagonisme accentué a été choisi. Après une condition contrôle, l'ISO est perfusé. Puis, des doses croissantes d'ACh sont ajoutées à la perfusion.



Voltage Clamp

La configuration « voltage clamp » permet de contrôler ou imposer le potentiel de membrane des cellules du NSA. Cela va permettre de mesurer des courants transmembranaires associés à la valeur imposée à la cellule.

Solutions utilisées

La solution physiologique utilisé est le Tyrode, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

La stimulation β-adrénergique est induite par l'ISO (Isoprénaline Hydrochloride, Sigma-Aldrich) à une concentration de 100 nM.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à des concentrations de 50 nM et 1 µM.

La solution extracellulaire contient : 135 mM tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10 mM 4-aminopyridine (4-AP), 1 mM $MgCl_2$, 0.03 mM tetrodotoxin (TTX), 1 g/L Glucose, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM Hepes, (ajusté à pH = 7.2 avec TEAOH)

La solution intracellulaire contient : 125 mM Cs^+-aspartate, 20 mM TEA-Cl, 1.2 mM $CaCl_2$, 5 mM Mg-ATP, 0.1 mM Li_2-GTP, 5 mM EGTA, and 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH). (Mangoni et al., 2003, 2006b)

Enregistrement des courant de dépolarisation diastolique

Un cycle court de potentiels d'action numérisés de cellules du NSA de souris contrôle a été utilisé comme protocole de voltage-clamp pour analyser les courants membranaires résultants dans les cellules du NSA à tester. Cette acquisition est effectuée en configuration voltage-clamp

Solutions utilisées

La solution physiologique utilisé est le Tyrode, qui permet d'enregistrer la condition contrôle de l'expérimentation.

La stimulation β-adrénergique est induite par l'ISO (Isoprénaline Hydrochloride, Sigma-Aldrich) à une concentration de 100 nM.

L'ACh (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) est utilisé à une concentration de 50 nM.

La solution intracellulaire contient : 130.0 mM K^+-aspartate ; 10.0 mM NaCl ; 2.0 mM ATP-Na^+ salt, 6.6 mM créatine phosphate, 0.1 mM GTP-Mg2+, 0.04 mM CaCl2 (pCa = 7.0), et 10.0 mM HEPES-KOH (ajusté à pH 7.2 avec du KOH)

Analyses

Les analyses de ces données se font sur le logiciel Clampfit (10.7, Molecular Devices) qui permet d'analyser la fréquence des potentiels d'action, le courant calcique de type L et le courant diastolique des cellules du NSA.

Enregistrement *in vivo* d'ECG - Télémétrie

L'enregistrement en continu *in vivo* d'ECG 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).

Les expérimentations *in vivo* de cette étude ont été pratiquées sur les génotypes des souris précédemment décrites.

Anesthésie et préparation de la souris

Pendant les 24h précédant l'intervention, les souris sont soumises à de l'Advil® (enfant/nourrisson à 20 mg/kg) dans leur eau de boisson qui contient 7 ml/L de cet anti-inflammatoire. Le transmetteur est traité dans une solution désinfectante (Stéranios®20).

Le jour même de l'intervention, chaque transmetteur sera soigneusement rincé à l'eau avant l'implantation et chacun des deux fils sera dénudé sur quelques millimètres à environ 0.5 cm du bout. Ces parties dénudées permettront de conduire correctement le signal enregistré lorsqu'elles seront placées en contact d'un muscle.

La souris est anesthésiée à l'isoflurane (Isocare), sous forme gazeux, à une concentration comprise entre 2.5 et 3% dans la cage à induction. L'observation de la souris, et notamment de sa respiration, doit être constante et minutieuse : si sa respiration devient saccadée et que la

souris présente des signes de détresse respiratoire, le pourcentage d'isoflurane est immédiatement réduit à 2%.

Elle est alors placée sur un champ opératoire stérile, sous une lampe chauffante qui prévient l'hypothermie, et l'anesthésie se poursuit par un masque qui est apposé sur le museau de la souris. La concentration d'anesthésique peut alors être réduite à un pourcentage entre 1.5 et 2%.

La tonte du pelage est effectuée sur une partie du dos, du flan et du thorax de l'animal et l'environnement est de nouveau désinfecté. Cela va permettre de dégager les zones d'intérêts et de limiter les risques de contamination.

Protocole chirurgical

Le corps de la souris est abondamment désinfecté à la Bétadine® dermique 10 %. Afin de contrôler que l'anesthésie est complète, la perte des réflexes est contrôlée par pression de la queue ou de la patte. Dans le but de procéder à l'implantation du transmetteur, trois incisions sont pratiquées : Une incision longitudinale (< 1,5 cm) sur le dos de la souris ainsi que deux petites incisions transversales (< 3 mm) sur sa face ventrale : une au niveau sous sternal gauche, la seconde sous-claviculaire droite (Figure 47). Ces incisions permettent le positionnement des fils du transmetteur selon la dérivation D2 de l'ECG d'après le triangle d'Einthoven (Figure 48).

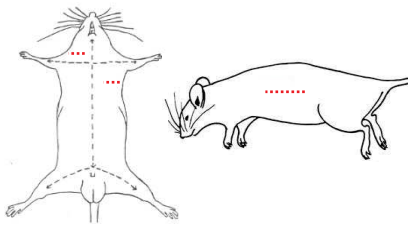


Figure 47: Illustration des sutures souris

Les adhérences entre la peau et le tissu conjonctif sous-cutané sont sectionnées à l'aide d'un ciseau à bouts ronds afin de permettre le passage des fils et le bon positionnement du transmetteur sous la peau. Grâce à l'utilisation d'un trocard, les deux fils sont acheminés de l'incision dorsale à l'incision sous sternale. Un premier fil reste positionné au niveau de cette

incision. Le second, toujours à l'aide du guide, va être placé jusqu'à l'incision sous-claviculaire. Chacun des fils sera alors fixé sur sa zone à l'aide de point réalisé avec du fil Prolène 5.0 sur les muscles intercostaux et au niveau de la partie dénudée ultérieurement. Le transmetteur est alors placé au niveau de l'incision dorsale, en sous-cutanée. Les incisions cutanées sont ensuite suturées (2 à 3 points). 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, de la Bétadine® dermique à 10 % est appliquée sur les sutures et sur la peau environnante.

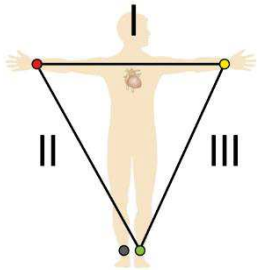


Figure 48: Illustration des dérivations utilisé en échocardiographie dont la dérivation II d'après le triangle d'Einthoven.

Suivi post-intervention

Durant les sept jours suivant l'intervention, les souris sont contrôlées quotidiennement : la cicatrisation des sutures, le poids, la toilette, la respiration, la diurèse sont les points de contrôle d'une bonne récupération de la chirurgie. Dans le cas d'un signe de souffrance, où qu'une perte de poids importante est constatée, l'euthanasie est pratiquée par dislocation cervicale, après administration d'une dose d'anesthésique.

Enregistrement d'ECG

Les souris sont placées dans une pièce en cycle lumineux inversé (période de nuit : 8h30-20h30, période de jour : 20h30-8h30) afin de procéder aux enregistrements pendant la période

active de la souris qui est un animal nocturne. L'adaptation des animaux au cycle lumineux inversé s'effectue durant les 2 semaines qui précédent l'implantation des transmetteurs.

Afin que les souris récupèrent de la chirurgie et s'adaptent à la présence de l'implant (1.6g). Les premiers enregistrements électrocardiographiques sont réalisés 15 jours après la pose du transmetteur ECG.

Chaque série d'enregistrement commence par 2 fois 24 heures d'enregistrement afin de déterminer le rythme cardiaque basal des animaux sur leur période d'activité (12 h noir) et de repos (12 h lumière).

Pour les enregistrements avec utilisation de drogues, l'enregistrement commence environ 4 à 5 heures avant injection. L'administration de la drogue se fait par injection intra-péritonéale (volume de 0.5 ml). Afin de suivre l'effet de la molécule injectée, l'enregistrement est réalisé 4 à 5 heures après l'injection.

Solutions injectées

- NaCl : 0,9 g pour 100 (Lavoisier, France)
- Carbamoylcholine chloride (Carbachol) 0.2 mg/kg (Sigma Aaldrich). Un cholinomimétique qui se lie aux récepteurs M2 muscariniques.
- Hexamethonium 10 mg/kg (Sigma Aaldrich). L'hexamethonium est un bloqueur des recepteurs nicotiniques du système nerveux autonome.
- 2-Chloro-N^6-cyclopentyladenosine (CCPA) 0.1 mg/kg (Sigma Aaldrich). Le CCPA est un agoniste des récepteurs A1 adénosine.

Analyses

Les analyses ont été effectuées sur le logiciel ECG auto 1.5.7 (EMKA technologie, Paris, France) en prenant en compte le HR.

Résultats

Les acteurs de la régulation adrénergique

Dans une étude en cours dans l'équipe, le rôle des canaux $Ca_v1.3$ et HCN4 dans la régulation adrénergique de l'automatisme cardiaque est étudié. Lors de diverses expérimentations, et notamment à l'aide de la télémétrie, deux acteurs ont été révélés comme essentiels à la régulation de la fréquence cardiaque par la voie adrénergique.

Pour cela, des souris WT, HCN4-CNBD, $Ca_v1.3^{-/-}$ et HCN4-CNBD/$Ca_v1.3^{-/-}$ ont été implantées afin d'étudier leur fréquence cardiaque *in vivo*. Durant l'étude, chaque souris a été injectée avec 0.1 mg/kg d'isoprénaline afin d'observer la réponse de chacun de ces génotypes à une stimulation β-adrénergique.

Les souris WT, HCN4-CNBD et $Ca_v1.3^{-/-}$ ont présenté une augmentation significative de leur fréquence cardiaque après l'injection d'isoprénaline. Cela signifie que la régulation adrénergique y est encore effective (Figure 49).

Or, les souris HCN4-CNBD/$Ca_v1.3^{-/-}$ n'ont présenté aucune augmentation significative de leur fréquence cardiaque après cette stimulation β-adrénergique par l'isoprénaline (Figure 49, B).

Les canaux $Ca_v1.3$ et HCN4 de par leur activation AMPc-dépendante et la protéine kinase A (PKA) sont donc impliqués dans la régulation adrénergique de l'automatisme cardiaque.

Dans le contexte de ma thèse, et donc de la régulation cholinergique, il est apparu comme important d'étudier ces deux canaux dans cette régulation, et notamment de se pencher sur les interactions qui pourraient exister entre $Ca_v1.3$, HCN4, et GIRK1/4.

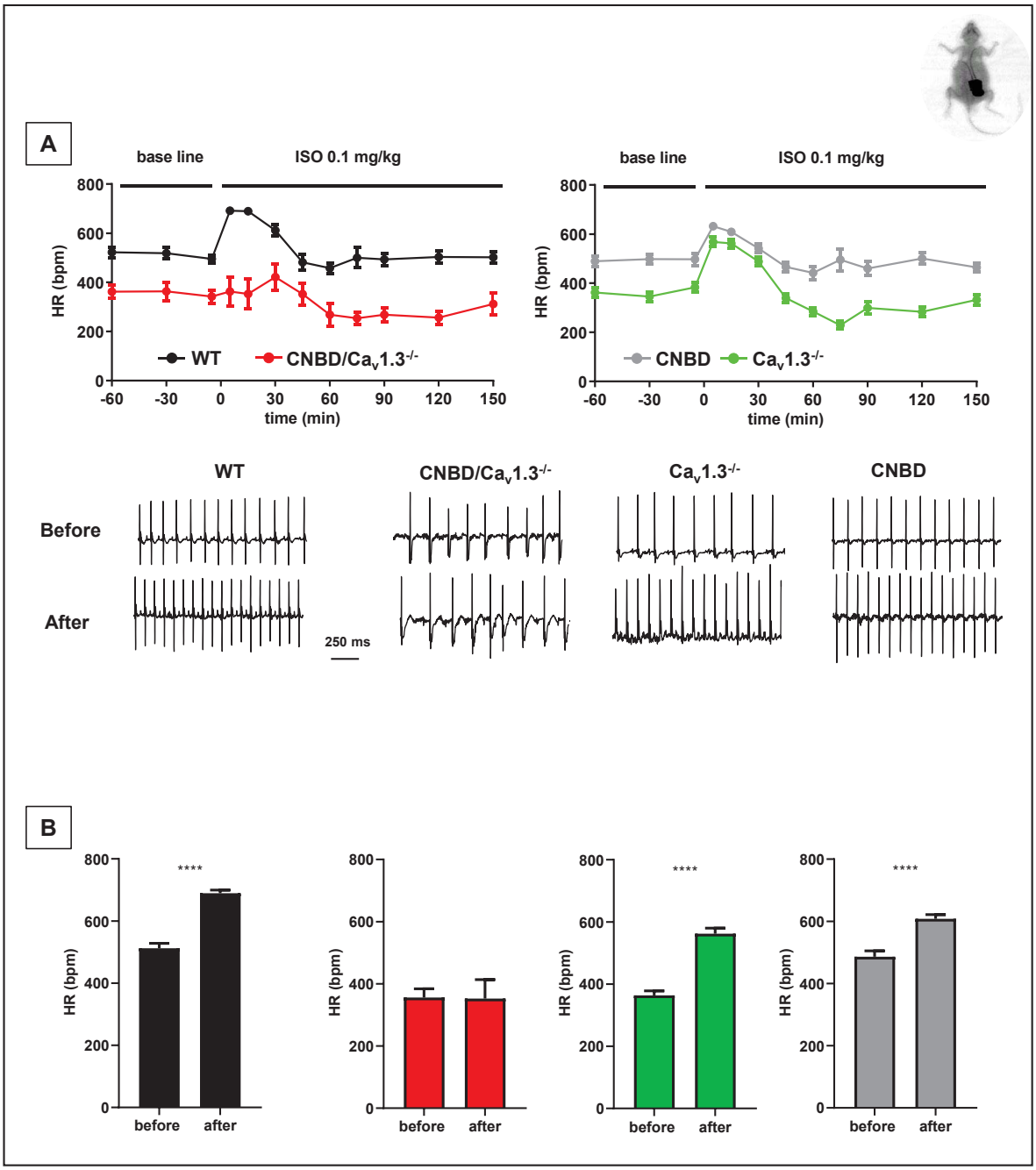


Figure 49: Etude de la fréquence cardiaque in vivo par télémétrie. A (haut): Moyenne de suivi dans le temps de la fréquence cardiaque avant et après stimulation β-adrénergique par injection IP d'ISO à 0.1 mg/kg de N=20 souris WT (tracé noir), N=8 souris HCN4-CNBD/$Ca_v1.3^{-/-}$ (tracé rouge), N=17 souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (tracé vert) et N=17 souris HCN4-CNBD (tracé gris). A (milieu) : tracé ECG avant injection d'ISO et A (bas) : tracé ECG après injection d'ISO des quatre génotypes. B : Histogramme des moyennes des fréquences cardiaques avant et après injection d'ISO des quatre génotypes. Test statistique : t-test appareillé.

Etude de la fréquence cardiaque *in vivo* en présence d'agoniste du système nerveux parasympathique

Le carbamoylcholine chlorure (Carbachol) est un cholinomimétique agoniste des récepteurs muscariniques pouvant être utilisé *in vivo*. L'utilisation de cette drogue permet d'étudier la réponse à une stimulation des récepteurs muscariniques M2.

La première concentration de Carbachol de 0.1 mg/kg injectée n'a pas significativement réduit la fréquence cardiaque des souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$.

La seconde concentration de 0.2 mg/kg de Carbachol réduit significativement la fréquence cardiaque des souris WT de 30% et des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ de 59%. Mais les souris $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ restent insensibles. L'ablation génétique de GIRK1/4 contrebalance alors la réduction de 29% supérieure des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ par rapport à la réduction observée chez les souris WT (Figure 50 A).

La différence de pourcentage de réduction de la fréquence cardiaque des quatre génotypes pour 0.1 mg/kg de Carbachol (Figure 50 B) et 0.2 mg/kg de Carbachol (Figure 50 C) montre cependant un effet dose-dépendant notamment pour les souris WT et $Ca_v1.3^{-/-}$. On remarque alors que l'ablation de I_{KACh} chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ permet de réduire cette sur-sensibilité au carbachol que l'on observe chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$.

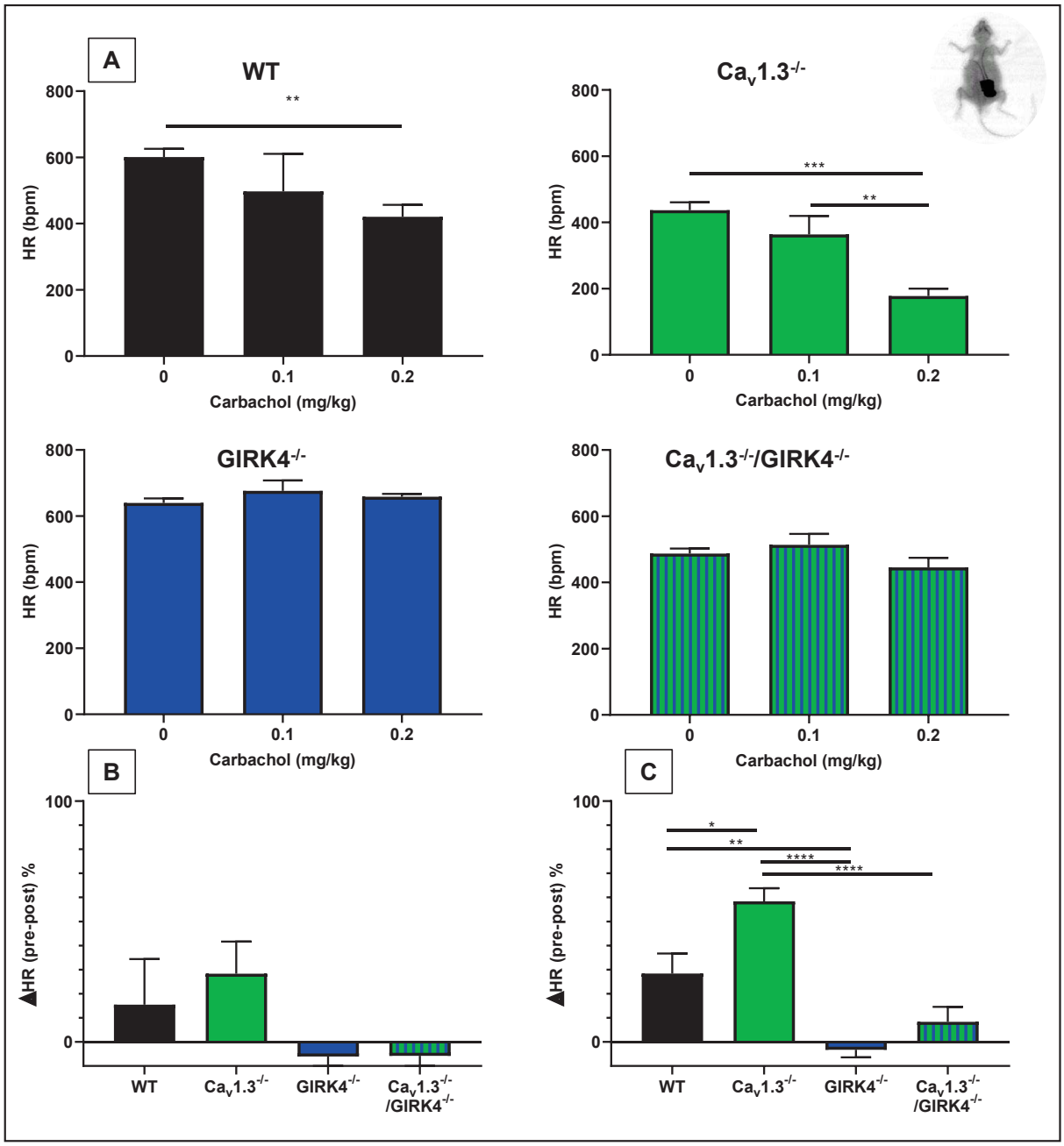


Figure 50: Moyenne des fréquences cardiaques avec injection IP de Carbachol (A) de souris WT (n=5 pour 0.1 mg/kg et n=6 pour 0.2 mg/kg), $Ca_v1.3^{-/-}$ (n=6 pour 0.1 mg/kg et n=7 pour 0.2 mg/kg), $GIRK4^{-/-}$ (n=5 pour 0.1 mg/kg et n=6 pour 0.2 mg/kg) et $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ (n=7 pour 0.1 mg/kg et n=7 pour 0.2 mg/kg). Différence de réduction de la fréquence cardiaque entre les génotypes pour Carbachol 0.1 mg/kg (B) et 0.2 mg/kg (C). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.*

Le 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA) est un agoniste du récepteur adénosine A1 que l'on retrouve à la surface des cellules pacemaker. Son utilisation *in vivo* dans le cadre de ces expérimentations permet d'étudier la réponse à une stimulation du système nerveux parasympathique par l'activation de la voie adénosinergique.

Le CCPA avec des injections à des concentrations de 0.1 mg/kg réduit significativement la fréquence cardiaque des souris WT de 48% des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ de 57% et enfin des souris $GIRK4^{-/-}$ de 36%. Le CCPA n'a pas d'impact significatif sur la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ (Figure 51). Ce résultat met en avant un lien entre $Ca_v1.3$ et GIRK1/4 dans la régulation cholinergique impliquant la voie adénosine et montre que les canaux $Ca_v1.3$ jouent un rôle important dans l'effet chronotrope négatif induit par les récepteurs A1.

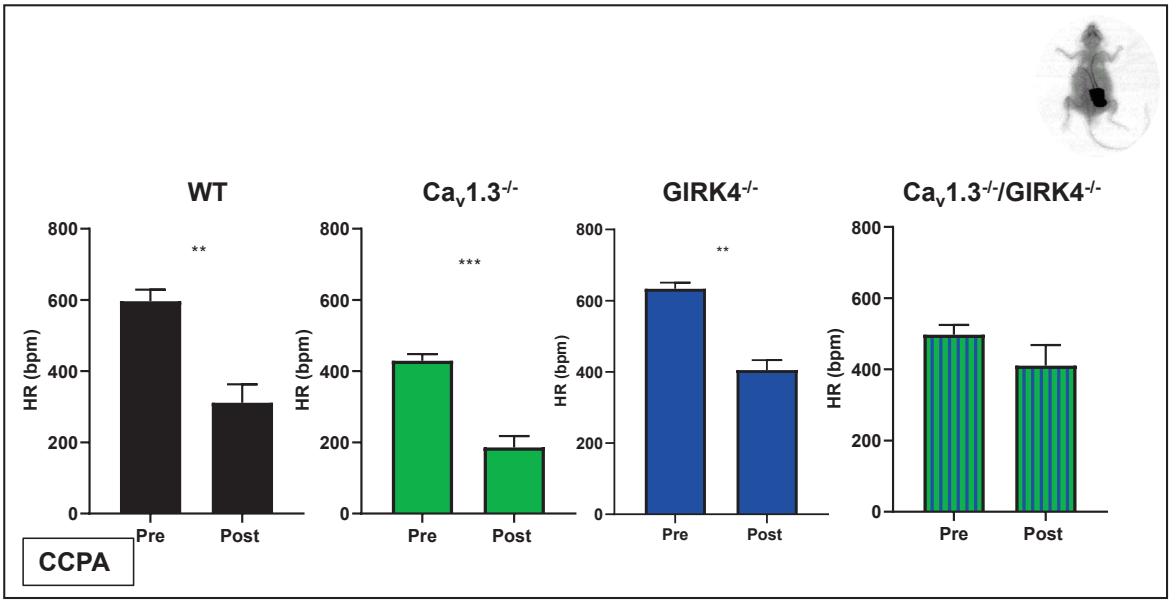


Figure 51: Moyenne des fréquences cardiaques avant et après l'IP de CCPA (10 mg/kg) pour 5 souris WT, 7 souris $Ca_v1.3^{-/-}$, 6 souris $GIRK4^{-/-}$ et 5 souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$. Test statistique : T test appareillé.

Afin d'étudier la régulation cholinergique *in vivo*, l'hexamethonium a été utilisé afin de limiter les effets sur le système nerveux autonome. L'hexamethonium est un bloqueur des récepteurs nicotiniques au niveau des ganglions du système nerveux autonome. Concernant l'injection d'Hexamethonium, aucune différence significative sur la fréquence cardiaque de base n'a été observé pour chaque génotype testé (Figure 52).

L'injection de cette molécule a été associée au carbachol, au CCPA et l'atropine et propranolol afin de déterminer son effet sur la fréquence cardiaque en présence d'agoniste ou d'antagoniste des récepteurs du système nerveux autonome et vérifier que la bradycardie induite par le carbachol et le CCPA était générée par les récepteurs M2 et A1 présentes sur les myocytes du nœud sinusal.

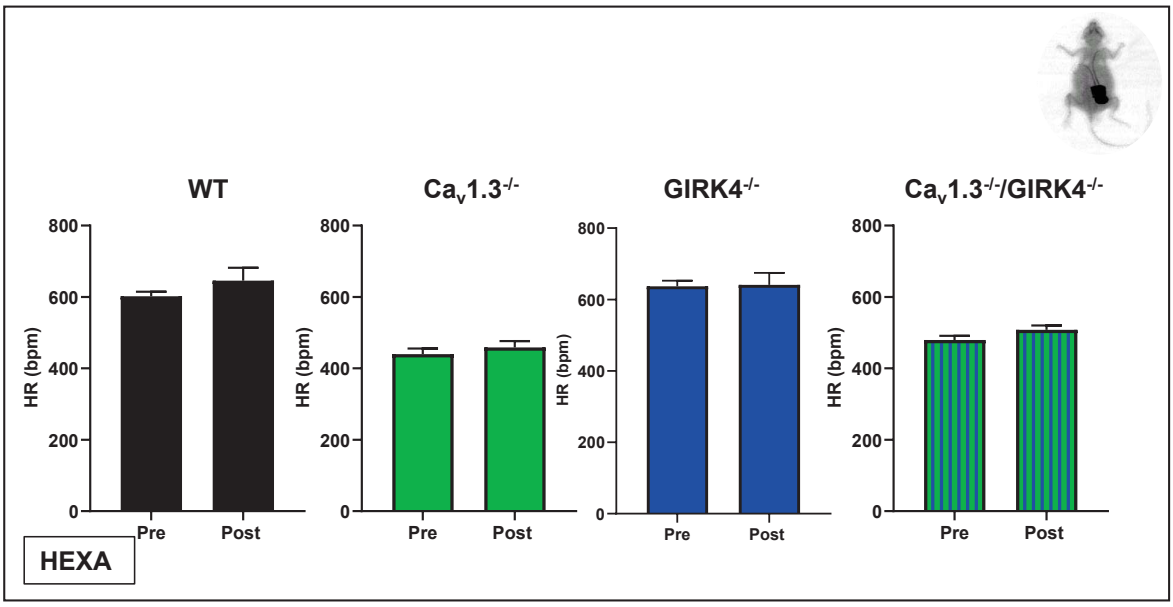


Figure 52: Moyenne des fréquences cardiaques avant et après l'IP d'HEXA (10 mg/kg) pour 5 souris WT, 6 souris $Ca_v1.3^{-/-}$, 6 souris $GIRK4^{-/-}$ et 7 souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$. Test statistique : T test appareillé.

Lorsque l'on observe la fréquence cardiaque des quatre génotypes testés avant et après les injections de carbachol à 0.2 mg/kg seul et de carbachol (à la même concentration) associé à l'hexamethonium (10 mg/kg), les tracés sont relativement similaires (Figure 53,54,55,56 A). Cependant, l'hexamethonium semble rallonger l'effet du carbachol pour les souris WT (Figure 53, A).

Concernant l'hexamethonium associé à l'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques) et au propranolol (antagoniste des récepteurs β-adrénergiques), on peut observer sur les tracés des fréquences cardiaques après injections pour les quatre génotypes testés que les fréquences cardiaques sont relativement similaires (aucune différences significatives) (Figure 53,54,55,56 B). Cela signifie que bloquer les régulations du système nerveux autonome en amont de la

surface des cellules pacemakers, par l'hexamethonium, ou directement sur la membrane des cellules pacemakers via les récepteurs des voies adrénergiques et muscariniques permet de s'affranchir, dans une certaine mesure, des régulations du système nerveux autonome.

L'utilisation de l'hexamethonium associé au CCPA a révélé un effet bradycardisant plus prononcé et plus important dans la durée notamment pour les quatre génotypes testés (Figure (Figure 53,54,55,56 C). Aucune différence significative n'a pu être observée concernant le différentiel de réductions de la fréquence cardiaque obtenue entre l'injection d'hexamethonium et celle d'hexamethonium associé au CCPA (Figure 53,54,55,56 D), mais on peut y observer une forte tendance de l'hexamethonium qui permettrait d'augmenter l'effet du CCPA.

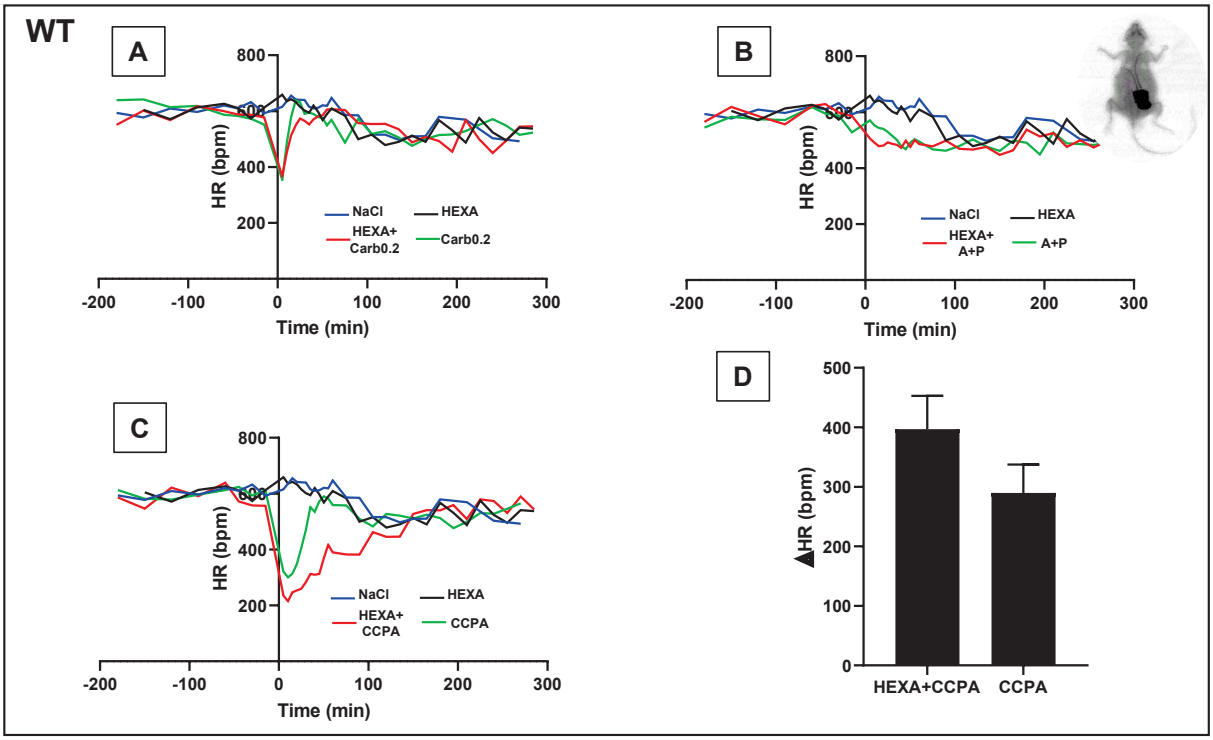


Figure 53: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris WT avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement.

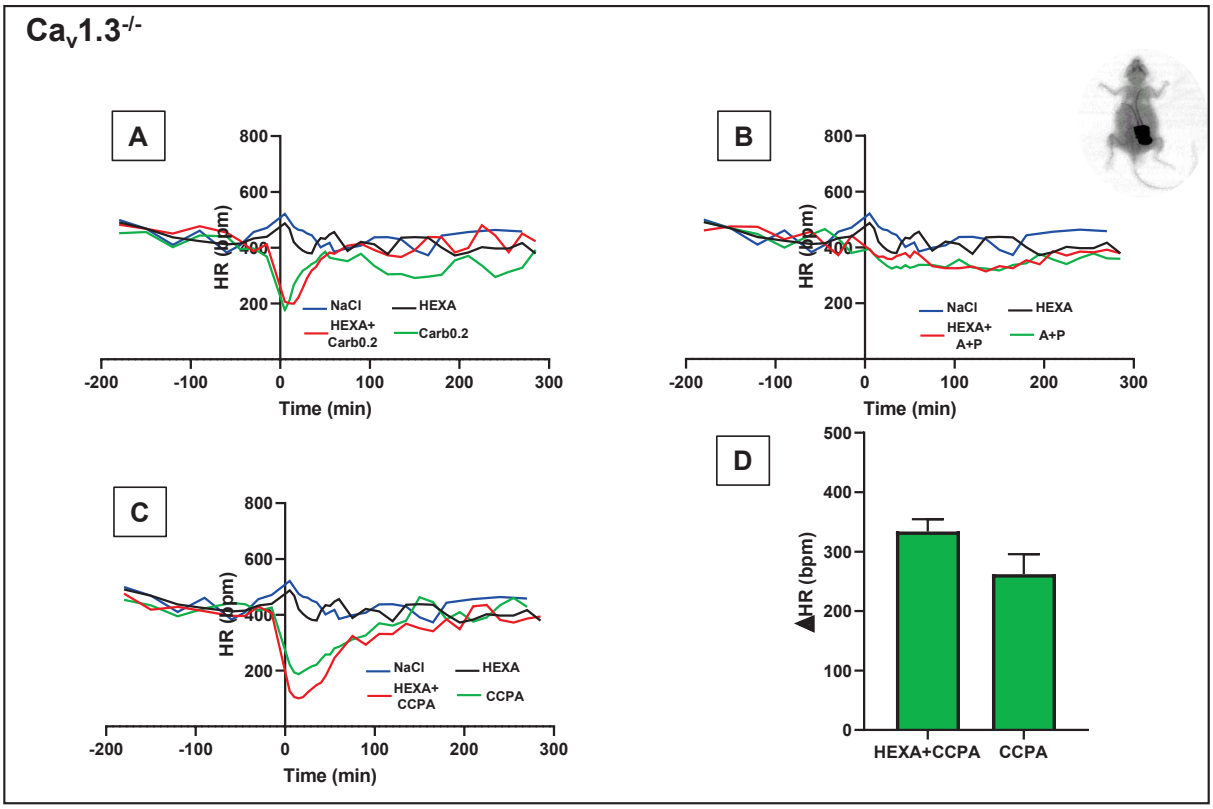


Figure 54: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement.

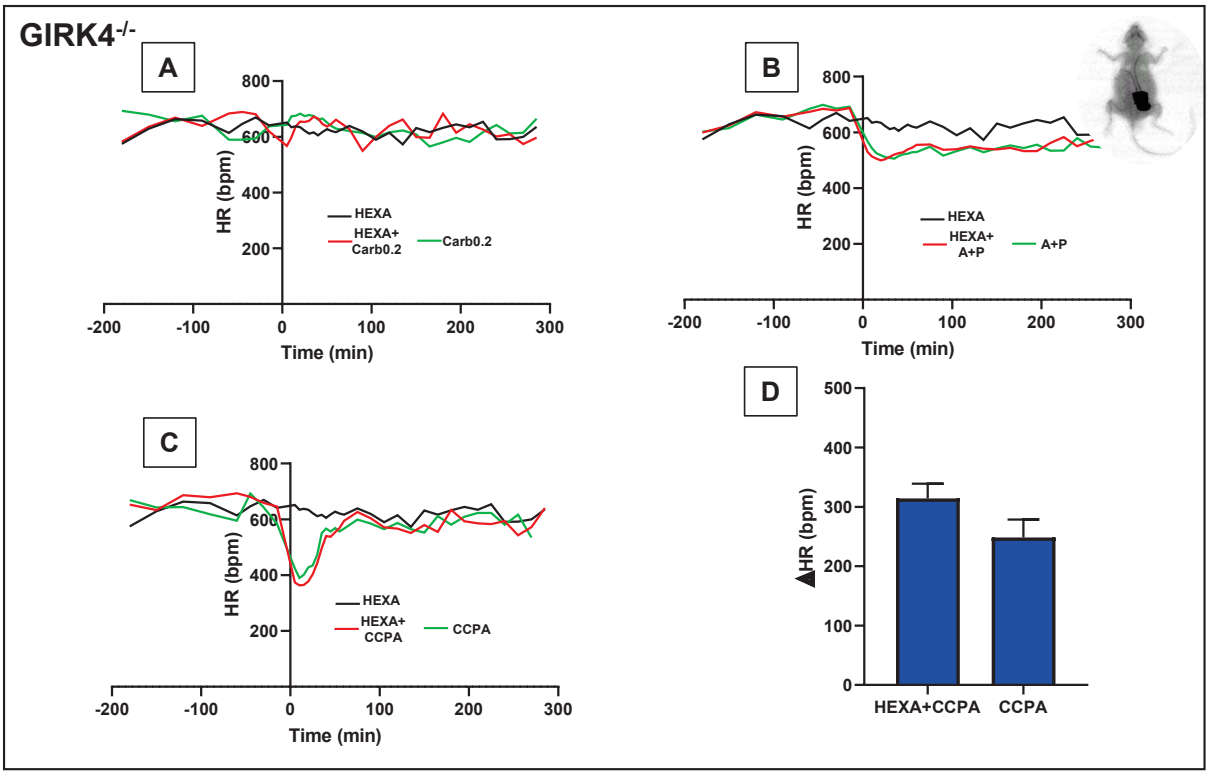


Figure 55: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris GIRK4$^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement.

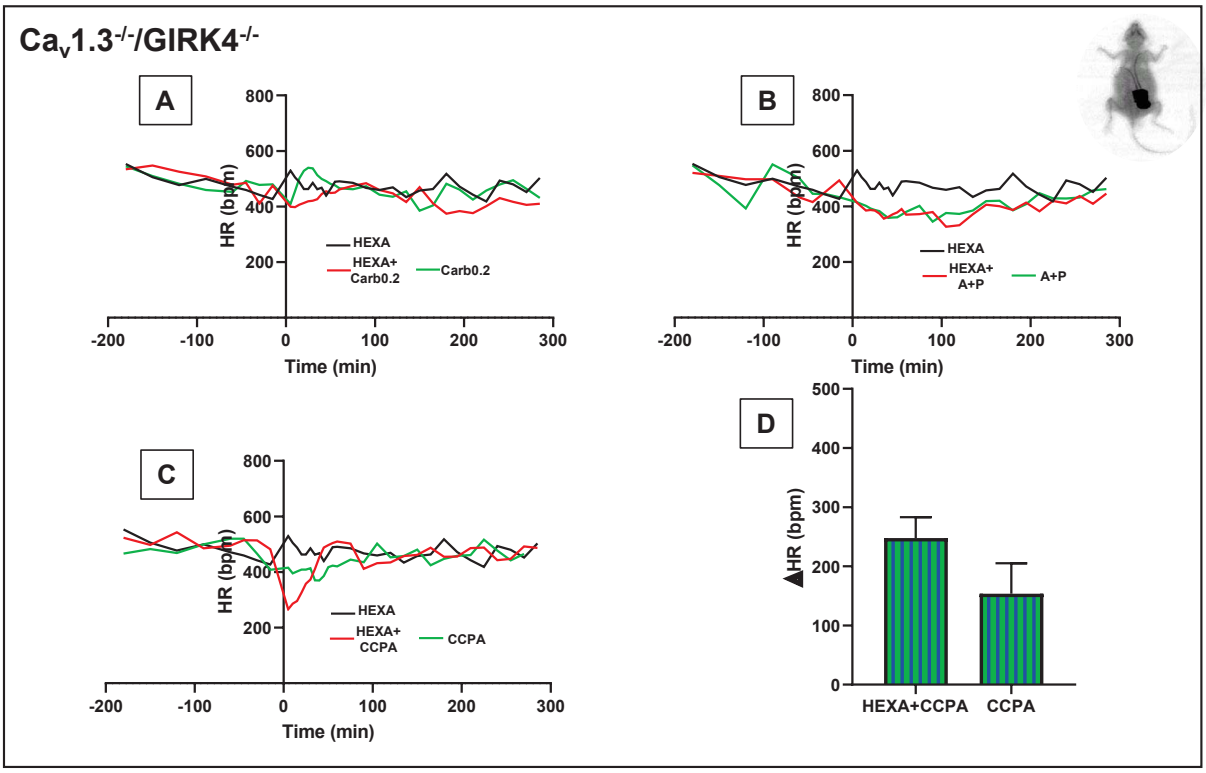


Figure 56: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement.

Etude de la fréquence cardiaque *ex vivo* en condition d'antagonisme accentué

L'expérimentation *ex vivo* sur cœur intact en configuration Langendorff permet une étude de l'activité électrique atriale en abolissant une majeure partie de l'influence du système nerveux autonome de l'animal. Le cœur est perfusé avec la solution choisie et son ECG.

En condition d'antagonisme accentué, c'est-à-dire avec une perfusion contenant de l'isoprénaline ainsi que des concentrations croissantes d'acétylcholine, il est possible d'étudier la capacité de récupération du cœur pour retrouver une fréquence cardiaque basale après une stimulation β-adrénergique.

Pour les six génotypes testés, l'isoprénaline a induit une augmentation de la fréquence atriale par rapport à la condition contrôle de 86% pour les cœurs WT, 27% des cœurs HCN4-CNBD, 83% des cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$, 80% des cœurs $GIRK4^{-/-}$, 61% des cœurs HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ et 117% des cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (Figure Supplémentaire 69 ; Figure 57 : ECG correspondant en bas à gauche en dessous de chaque histogramme par génotype).

Dans cette condition de stimulation adrénergique constante, la dose de 1 µM d'acétylcholine a réduit significativement la fréquence atriale des cœurs de souris WT de 19%, HCN4-CNBD de 24% et $GIRK4^{-/-}$ de 10% Il est à noter que les autres génotypes n'ont pas présenté de réduction significative de la fréquence atriale, en particulier les cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$, HCN4-CNBD ainsi que $Ca_v1.3^{-/-}$/$Girk4^{-/-}$. Ce premier point est important notamment concernant les cœurs des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. En effet, pour les cœurs des deux double-mutants, on peut s'attendre à un effet de l'acétylcholine amoindri, en effet ces souris ne possèdent plus le courant I_{KACh}. C'est pour cela que l'absence d'effet de cette dose d'acétylcholine sur les cœurs des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ qui possèdent encore ce courant sensible à l'acétylcholine, montre que les canaux $Ca_v1.3$ jouent un rôle dans la régulation cholinergique.

Une seconde dose d'acétylcholine de 3 µM cette fois a réduit significativement la fréquence atriale des cœurs des souris WT de 36%, HCN4-CNBD de 45%, $Ca_v1.3^{-/-}$de 20%, $GIRK4^{-/-}$ de 14% et HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ de 14% (en comparaison avec la fréquence atriale obtenue en isoprénaline) (Figure 57 : ECG en bas à droite en dessous de chaque histogramme par

génotype). Pour cette dose, seuls les cœurs ex vivo des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ n'ont pas répondu significativement à l'acetylcholine. De plus, il existe un effet dose-dépendant de l'acétylcholine chez certains génotypes. Entre les deux concentrations testées, les cœurs des souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$ et HCN4-CNBD ont perdu respectivement 16, 20 et 20% de fréquences atriales (Figure 57). Ce résultat suggère que les canaux $Ca_v1.3$ et I_{KACh} sont importants pour l'effet chronotrope négatif suite à l'activation des récepteurs M2 à de différentes concentrations d'ACh. Cette expérience met également en lumière le rôle de $Ca_v1.3^{-/-}$ dans la régulation cholinergique après une stimulation β-adrénergique. En effet dans la littérature, très tôt les canaux GIRK1/4 et HCN4 ont été désignés comme acteurs de la régulation cholinergique, GIRK1/4 par voie directe, et HCN4 par voie indirecte. Or, les cœurs des souris GIRK4$^{-/-}$ et des souris HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ présentent une réponse significative à l'acétylcholine. Cela soulève donc l'importance d'étudier de façon plus approfondie le lien qu'il pourrait exister entre les mécanismes déjà reconnus qui constituent la régulation cholinergique et le canal $Ca_v1.3$.

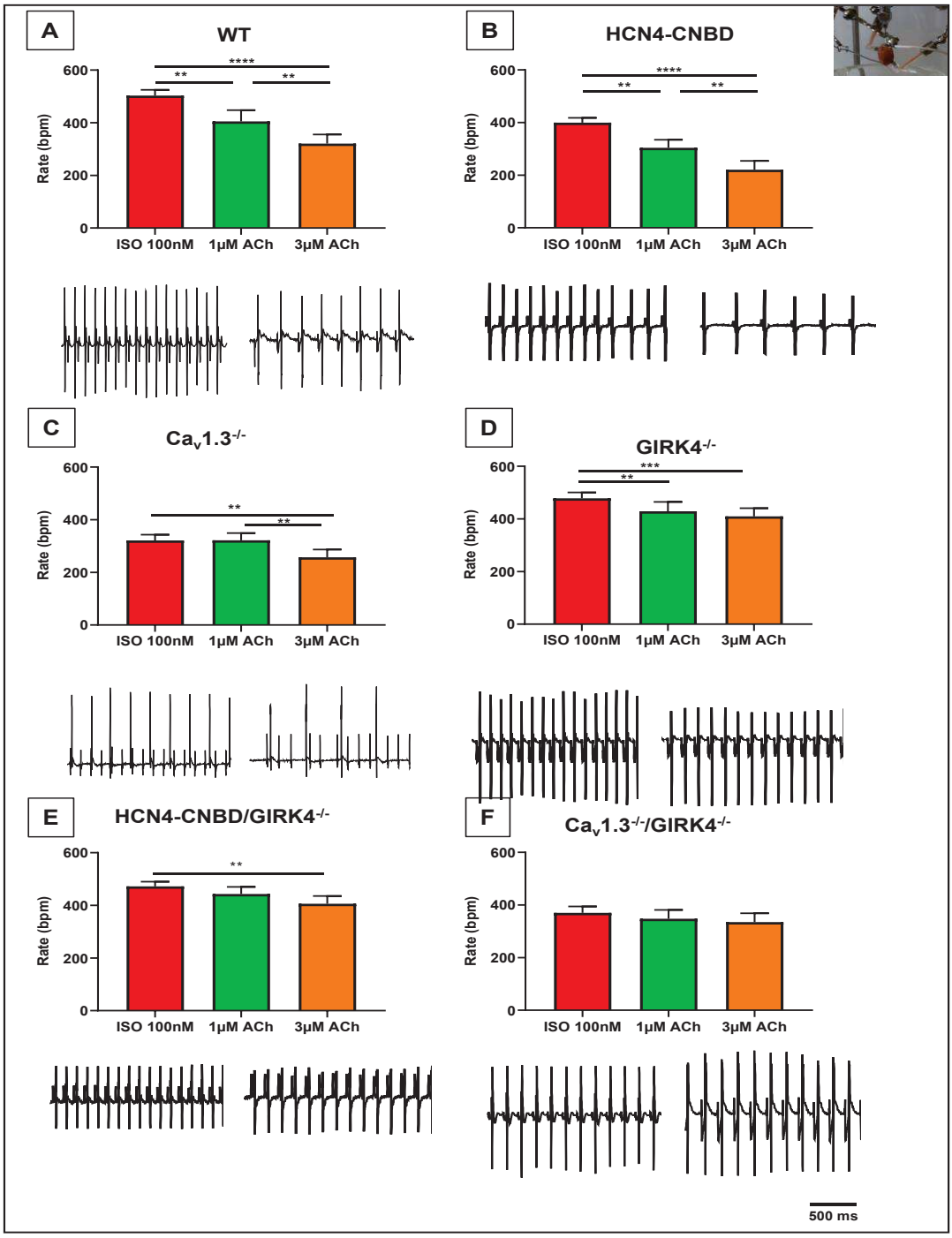


Figure 57: Etude ex vivo de l'ECG sur cœur isolé perfusé. Moyenne de la fréquence atriale en condition d'ISO à 0.1 µM (exemple de trace en bas à gauche), en ISO et ACh 1 µM puis ISO et ACh 3 µM (exemple de trace en bas à droite) pour N=15 cœurs WT (A), N=12 cœurs HCN4-CNBD (B), N=11 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), N=13 cœurs $GIRK4^{-/-}$ (D), N=13 cœurs HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et N=12 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (F). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.*

Etude de la fréquence de dépolarisation du tissu sinusal lors d'une régulation par le système nerveux parasympathique

La technique de cartographie permet sur le NSA intact entouré de son environnement atrial de pouvoir étudier les fréquences de dépolarisation du tissu ainsi qu'un potentiel déplacement du site d'initiation de l'activité pacemaker.

En effet comme évoqué précédemment, le site d'initiation se déplace en fonction des différents agents ioniques ou pharmacologiques auquel il est exposé (Boyett et al. 1998, 1999 ; Kodama et al. 1997 ; Opthof, 1988). De plus dans une récente étude de l'équipe, il a été démontré que l'ablation concomitante des canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v3.1$, ce site était détourné du NSA primaire vers le NSA secondaire voir même vers des zones extra-nodales (Baudot et al. 2020).

Les fréquences de dépolarisation n'ayant jamais été étudiées dans ces conditions expérimentales pour certains de ces génotypes. Nous avons donc voulu tester dans des expériences pilotes l'impact des canaux $Ca_v1.3$, HCN4 et I_{KACh} sur la génération de l'impulsion du nœud sinusal en l'absence et en présence d'acétylcholine. Cette série d'expérimentation a été effectués sans stimulation adrénergique.

La première concentration d'acétylcholine testé de 1 µM a statistiquement réduit la fréquence de dépolarisation des tissus sinusaux des souris WT de 27%, HCN4-CNBD 20.5%, $Ca_v1.3^{-/-}$ de 45%, $GIRK4^{-/-}$ de 18%, HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ de 14% et enfin $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ de 27.8%.

La seconde concentration d'acétylcholine perfusée de 10 µM va également réduire de façon statistiquement significative la fréquence de dépolarisation des tissus de tous les génotypes par rapport à la condition contrôle avec respectivement 60.8% (WT), 53% (HCN4/CNBD), 91% ($Ca_v1.3^{-/-}$), 20% ($GIRK4^{-/-}$), 14% (HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$) et enfin 30% ($Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$) (Figure 58, A-F).

Bien que tous les génotypes aient présenté une sensibilité à l'acétylcholine, les tissus sinusaux des souris WT, HCN4-CNBD et $Ca_v1.3^{-/-}$ ont présenté une réduction de la fréquence de dépolarisation dose-dépendant, en effet entre les deux doses d'acétylcholine une réduction significative de la fréquence de dépolarisation de respectivement 33.8, 32.5 et 46%. Ce second palier serait donc dû à la présence du courant I_{KACh} dans ces génotypes. En effet, pour les souris

n’exprimant pas ce courant, aucune différence significative de la fréquence de dépolarisation n’est observée entre les deux concentrations d’acétylcholine.

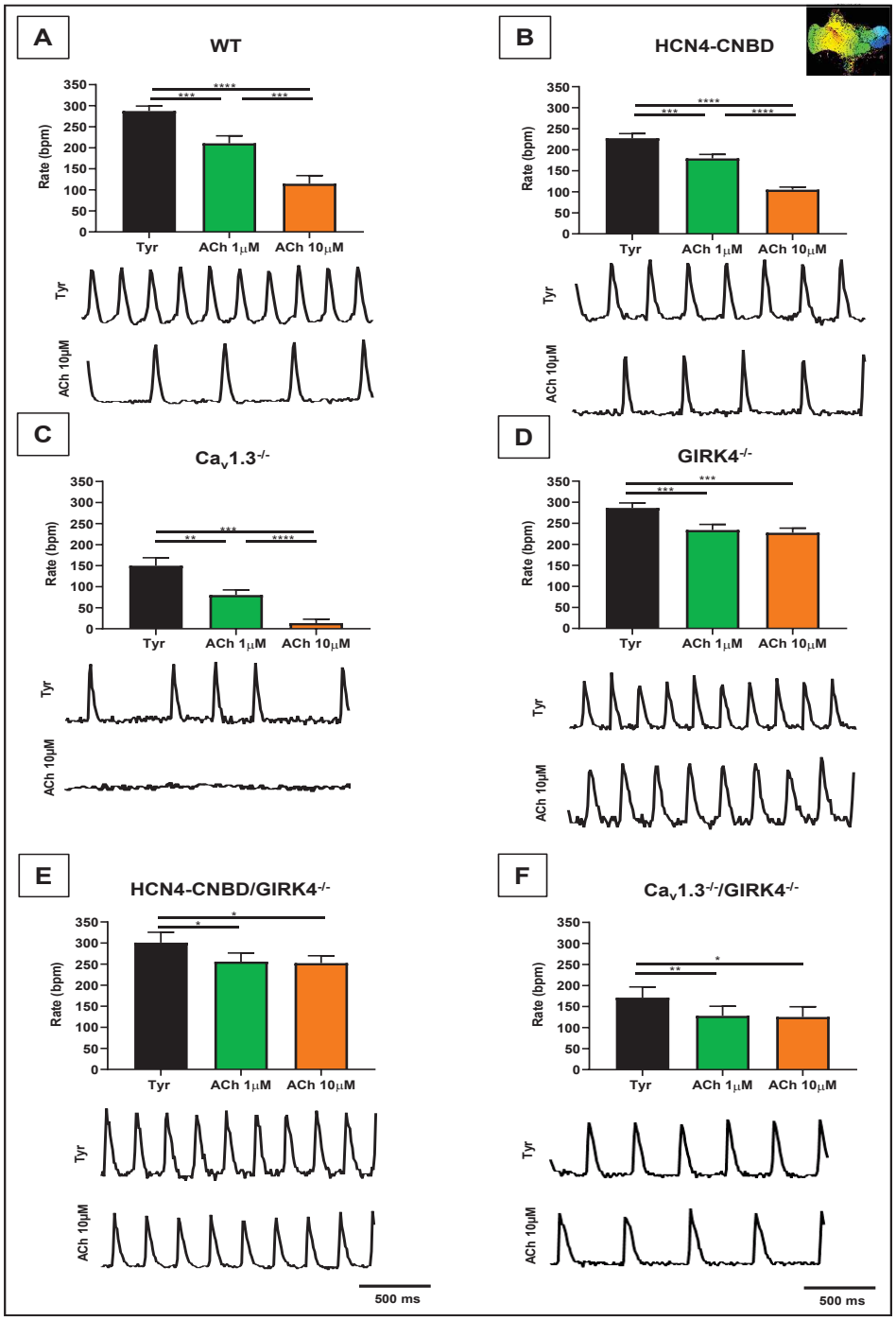


Figure 58: Etude de la fréquence de dépolarisation des tissu sinusaux par cartographie optique. Moyenne de la fréquence de dépolarisation en condition contrôle, après perfusion d'ACh à 1 µM, puis à 10 µM (en haut), avec tracé exemple en condition contrôle (milieu), et ACh 10 µM (bas) pour N=9 tissus WT (A), N=12 tissus HCN4-CNBD (B), N=11 tissus $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), N=11 tissus $GIRK4^{-/-}$ (D), N=8 tissus HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et N=7 tissus $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (F). Pourcentage de réduction de la fréquence de dépolarisation pour chaque génotype à ACh 1 µM (G) et 10 µM (H). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.*

Le second point de cette expérimentation concerne le possible déplacement du site d'origine de l'activité pacemaker. Les tissus sinusaux des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ (Figure 59, C, F) ont présenté une forte amplitude de déplacement à la première dose d'acétylcholine avec en moyenne respectivement 0.9 et 1.14 mm d'amplitude de déplacement par rapport aux sites d'initiation lors de la condition contrôle. Ces résultats rejoignent les précédentes conclusions de l'équipe concernant l'importance de la présence de $Ca_v1.3$ pour garder un site d'initiation de l'activité pacemaker dans la zone sinusale primaire. Les tissus des souris HCN4-CNBD présentent également de fort déplacement à la première concentration d'acétylcholine, avec en moyenne 0.5 mm.

C'est à la concentration d'acétylcholine plus élevée que les tissus des souris WT (avec 1 mm) ont rejoint les souris HCN4-CNBD, $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ pour ces importants déplacements par rapport aux sites d'initiation observés en condition contrôle (Figure 59, A, B, C, F).

Les seuls tissus sinusaux présentant un site d'initiation avec une très faible distance de déplacement proviennent des souris GIRK4$^{-/-}$ et HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ (Figure 59, D, E). Il semble donc que ce soit le courant I_{KACh} qui soit responsable du déplacement du site d'initiation lors de la régulation cholinergique. Mais le fait que le site d'initiation sur les tissus des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ ait présenté des déplacements importants, malgré l'absence de ce courant,

semble mettre en dualité l'importance de I_{KACh} pour le déplacement de ce site lors de cette régulation, avec le rôle de $Ca_v1.3$ concernant la localisation intra-nodale du site d'initiation.

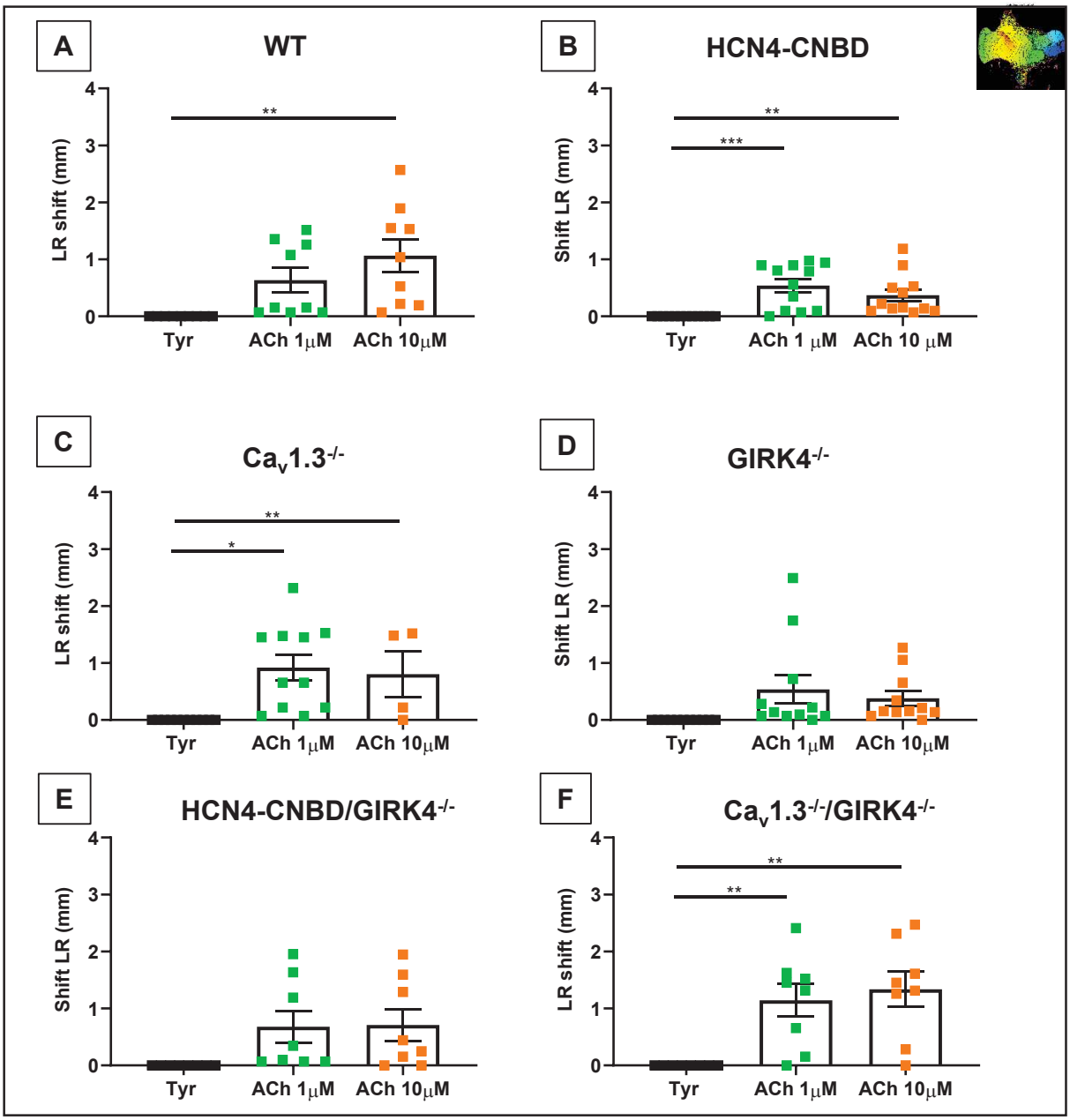


Figure 59: Moyenne de déplacement du site d'origine de la dépolarisation sur le tissu sinusal en fonction de la condition contrôle après perfusion d'ACh 1 µM et ACh 10 µM pour N=9 tissus WT (A'), N=12 tissus HCN4-CNBD (B'), N=11 tissus $Ca_v1.3$-/- (C'), N=11 tissus GIRK4$^{-/-}$ (D'), N=8 tissus HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ (E'), et N=8 tissus $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ (F'). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.*

Etude de l'automatisme cardiaque par analyse des potentiels d'action des cellules pacemaker

L'étude des cellules isolées du NSA par technique de patch-clamp en configuration « current clamp » permettent d'analyser la fréquence de l'automatisme cardiaque par le biais des potentiels d'action. Ces expérimentations ont, tout comme celles en technique de Langendorff, été enregistré en configuration d'antagonisme accentué.

L'étude des cellules isolées du NSA par technique de patch-clamp en configuration « current clamp » permet d'enregistrer la fréquence de l'automatisme cardiaque par le biais des potentiels d'action. Ces expérimentations ont été effectuées, tout comme celles en technique de Langendorff, en conditions d'antagonisme accentué.

En conditions de contrôle, la fréquence des potentiels d'action de chacun des génotypes est de 233 PA/min pour les WT, 148 PA/min pour les HCN4-CNBD, 141PA/min pour les $Ca_v1.3^{-/-}$, 244 PA/min pour les $GIRK4^{-/-}$, 207 PA/min pour les HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ et enfin 223 pour les cellules isolées des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. Pour les six génotypes testés, l'isoprénaline a induit une augmentation de la fréquence des potentiels d'action des WT (64.7%), HCN4-CNBD (62%), $Ca_v1.3^{-/-}$ (38%), $GIRK4^{-/-}$ (75.8%), HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (67%) et enfin $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (52%) (Figure 60 : exemple d'un tracé de potentiel d'action en condition isoprénaline en rouge sous l'histogramme associé au génotype) (Figure Supplémentaire 70).

Sous stimulation adrénergique, la première dose d'acétylcholine de 50 nM a significativement réduit la fréquence de potentiel d'action (par rapport à la condition ISO) des cellules de NSA des souris WT de 67.5% (Figure 60 : exemple de tracé de potentiel d'action dans cette condition en bleu pour le génotype WT) et HCN4-CNBD de 97% et a complètement abolit l'automatisme cardiaque des cellules du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. La seconde dose d'acétylcholine à 1 µM a également aboli l'activité des potentiels d'action des cellules pacemaker des souris WT et HCN4-CNBD (Figure 60 A-C). Ces résultats montrent l'importance des canaux $Ca_v1.3$ et HCN4 dans la génération de l'automatisme en présence de stimulation adrénergique.

Cependant, lorsque l'on étudie les cellules de NSA isolées des génotypes ne possédant plus le courant I_{KACh}, l'effet observé n'est plus le même. Tout d'abord la concentration de 50 nM

d'acétylcholine n'a induit aucune réduction significative de la fréquence des potentiels d'action dans les cellules isolées des souris GIRK4$^{-/-}$, HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ ou bien encore $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ (Figure 60 D-F). Ces résultats montrent que I_{KACh} est responsable de l'arrêt de l'automatisme dans les cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ et HCN4-CNBD.

La seconde concentration d'acétylcholine a bien montré une réduction significative de la fréquence des potentiels d'action (par rapport à la condition ISO) de 34% pour des souris GIRK4$^{-/-}$, de 20% pour HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ et enfin de 21% pour $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ (Figure 60 : exemple de tracé de potentiels d'action en vert sous les histogrammes associés aux génotypes). Il apparait donc que dans cette configuration, il n'est plus possible de bloquer la régulation cholinergique si le courant I_{KACh} n'est plus présent. Cependant, il apparait qu'à la plus forte dose d'acétylcholine, la fréquence des potentiels d'action des cellules des souris HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ est moins réduite que pour les cellules des souris GIRK4$^{-/-}$. Il semble donc que lorsque I_{KACh} n'est plus exprimé, le canal $Ca_v1.3$ ainsi que l'activation AMPc-dépendante de HCN4 jouent un rôle dans la régulation cholinergique dans cette configuration.

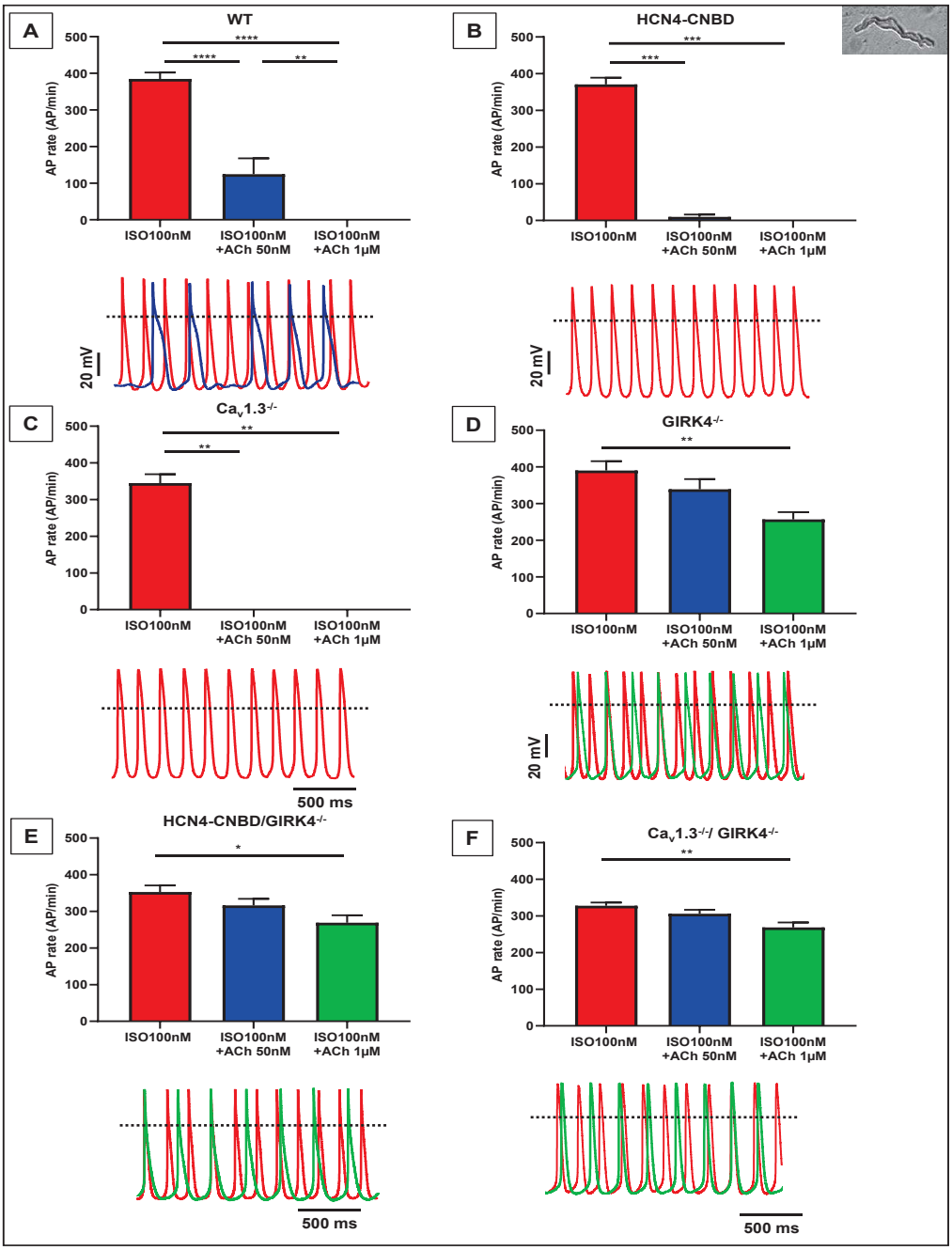


*Figure 60: Enregistrement de l'activité spontanée des potentiels d'action en current-clamp. Moyenne de la fréquence des potentiels d'actions des cellules isolées du NSA avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM pour n=13 cellules WT (A), n=12 cellules HCN4-CNBD (B), n=8 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (D), n=12 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et n=10 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (F) en haut. En bas, tracé exemple en rouge de la condition d'ISO à 0.1 µM, en bleu la condition d'ISO et ACh 0.05 µM et en vert la condition d'ISO et d'ACh 1 µM. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.*

Etude de la dynamique calcique intracellulaire en condition d'antagonisme accentué

L'imagerie par microscopie confocale permet d'étudier l'activité de la dynamique calcique intracellulaire dans le contexte de la régulation cholinergique de l'activité pacemaker.

Ces expérimentations ont été effectuées en condition d'antagonisme accentué.

La concentration d'acétylcholine de 50 nM a significativement réduit la fréquence des transitoires calciques pour les cellules des souris WT de 66%, $Ca_v1.3^{-/-}$ de 63%, $GIRK4^{-/-}$ de 51% HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ de 41% et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ de 58% (Figure 61).

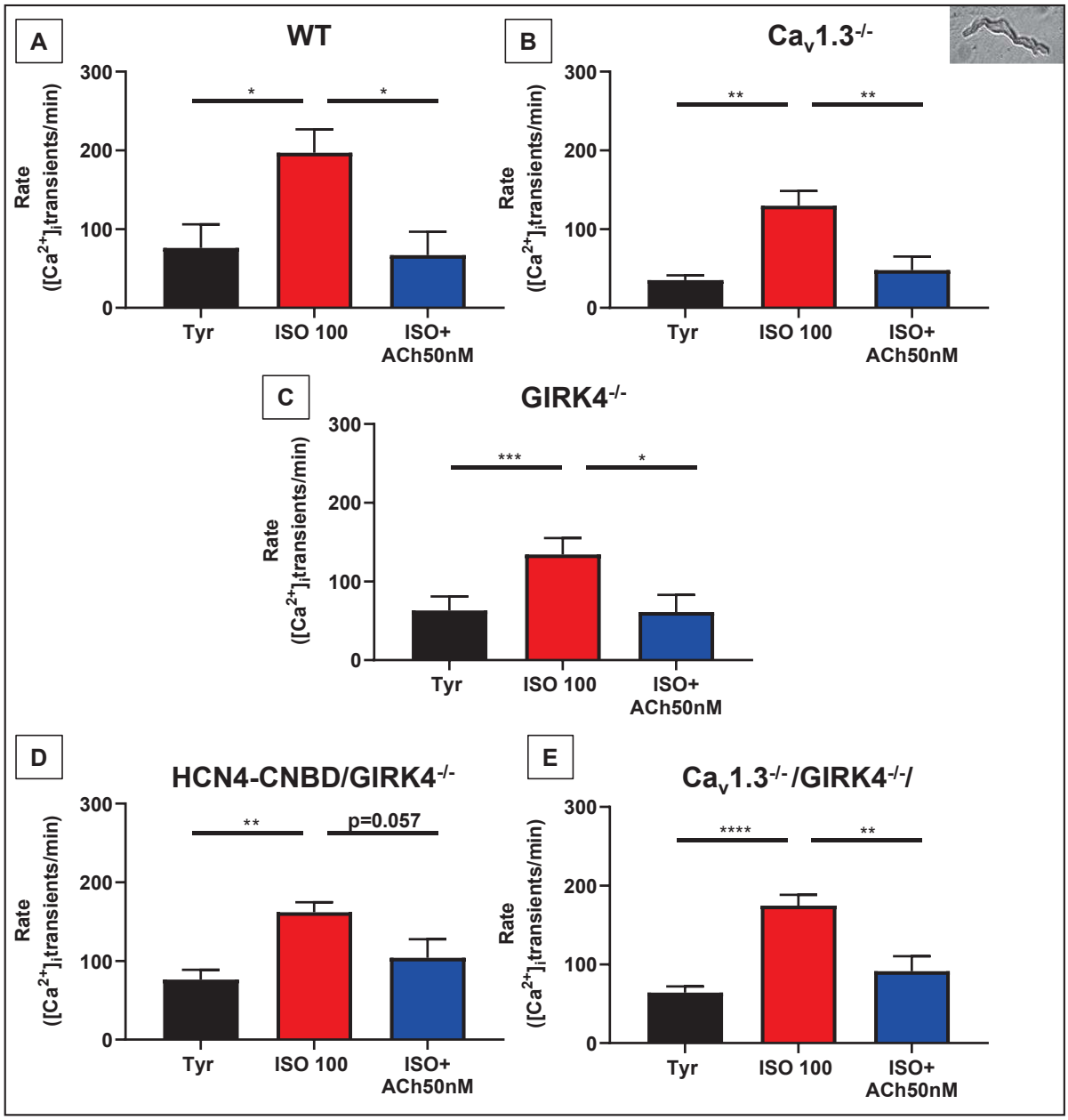


Figure 61: Etude de la dynamique calcique dans les cellules pacemaker. En condition d'ISO à 0.1 µM et en ISO et ACh à 0.05 µM, A : Moyenne de la fréquence des transitoires calciques, pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey*

L'analyse des LCR montre une augmentation significative dans les cellules de souris WT dans la condition d'antagonisme accentué après une stimulation β-adrénergique mais aucune autre différence significative pour les autres génotypes. Dans la même condition expérimentale, le nombre de LCR est statistiquement plus élevé pour le génotype WT par rapport aux génotypes $Ca_v1.3^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ en présence d'acétylcholine. La suppression génétique de $Ca_v1.3$ semble alors réduire l'activité « Ca^{2+} clock » et le déconnecter de l'automatisme durant la régulation cholinergique en condition d'antagonisme accentué (Figure 62 F).

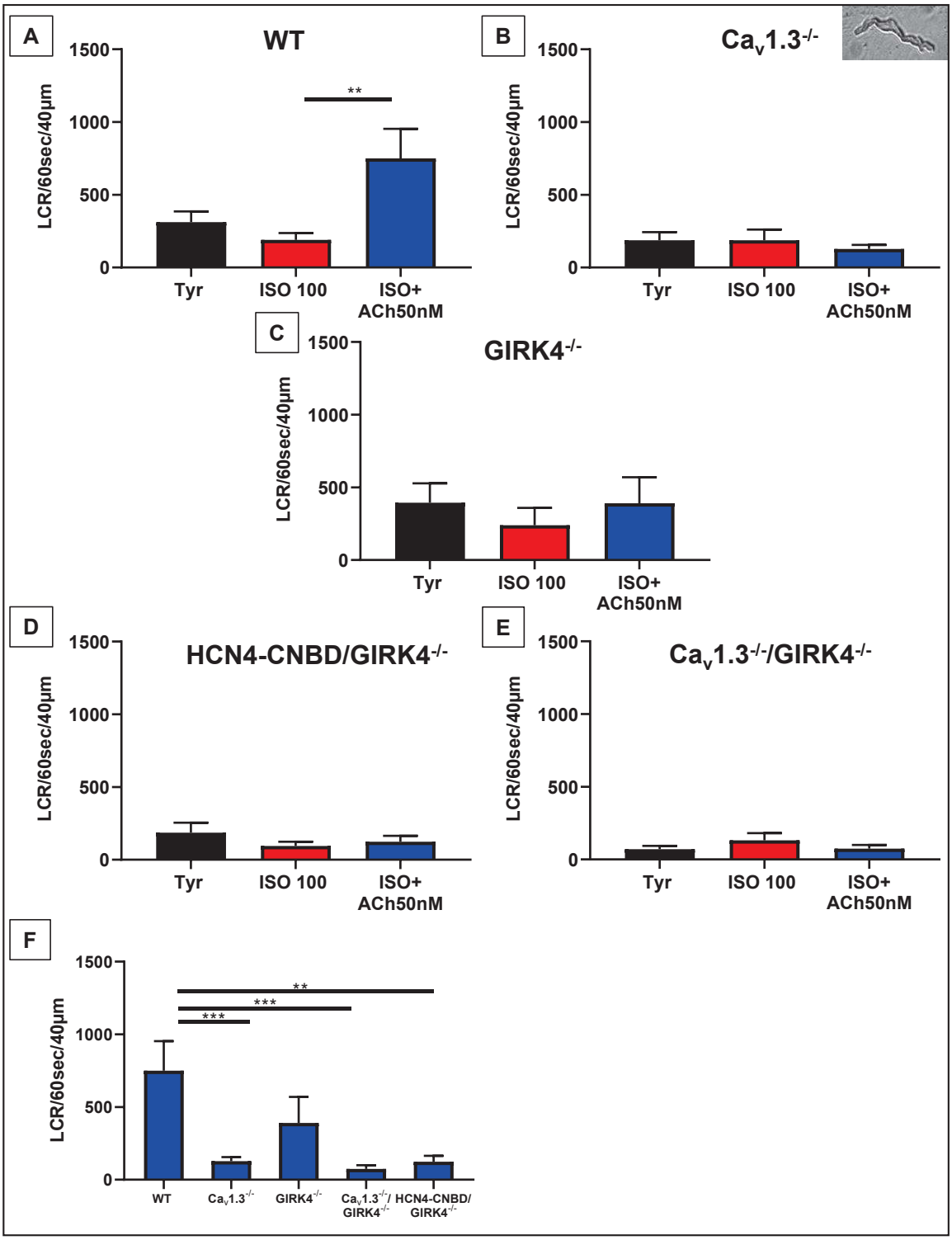


Figure 62: Moyenne du nombre de libération locales de calcium (LCR), pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). F : Résumé des moyennes des LCR dans la condition ISO et ACh *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey.*

Les rapports F/F0 permettant d'étudier l'amplitude des transitoires calciques ne montrent aucune différence significative en condition de stimulation β-adrénergique ou en condition d'antagonisme accentué (Figure 63 A-E). Mais l'amplitude des transitoires calciques en condition d'antagonisme accentué des cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ est significativement plus élevée que pour les cellules WT et HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$. Dans la même configuration expérimentale, l'amplitude des transitoires calciques des cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ n'est pas significativement différente de celle des cellules WT, l'ablation concomitante des canaux $Ca_v1.3$ et I_{KACh} permettrait alors de corriger l'augmentation de cette amplitude de transitoires calciques que l'on observe lorsque le canal $Ca_v1.3$ est absent (Figure 63 F).Ces résultats confirment que la délétion des canaux $Ca_v1.3$ entraine un rythme plus lent et une charge plus importante du réticulum sarcoplasmique. L'accélération de la fréquence liée à l'ablation des canaux I_{KACh} permet de rétablir la charge au niveau plus bas.

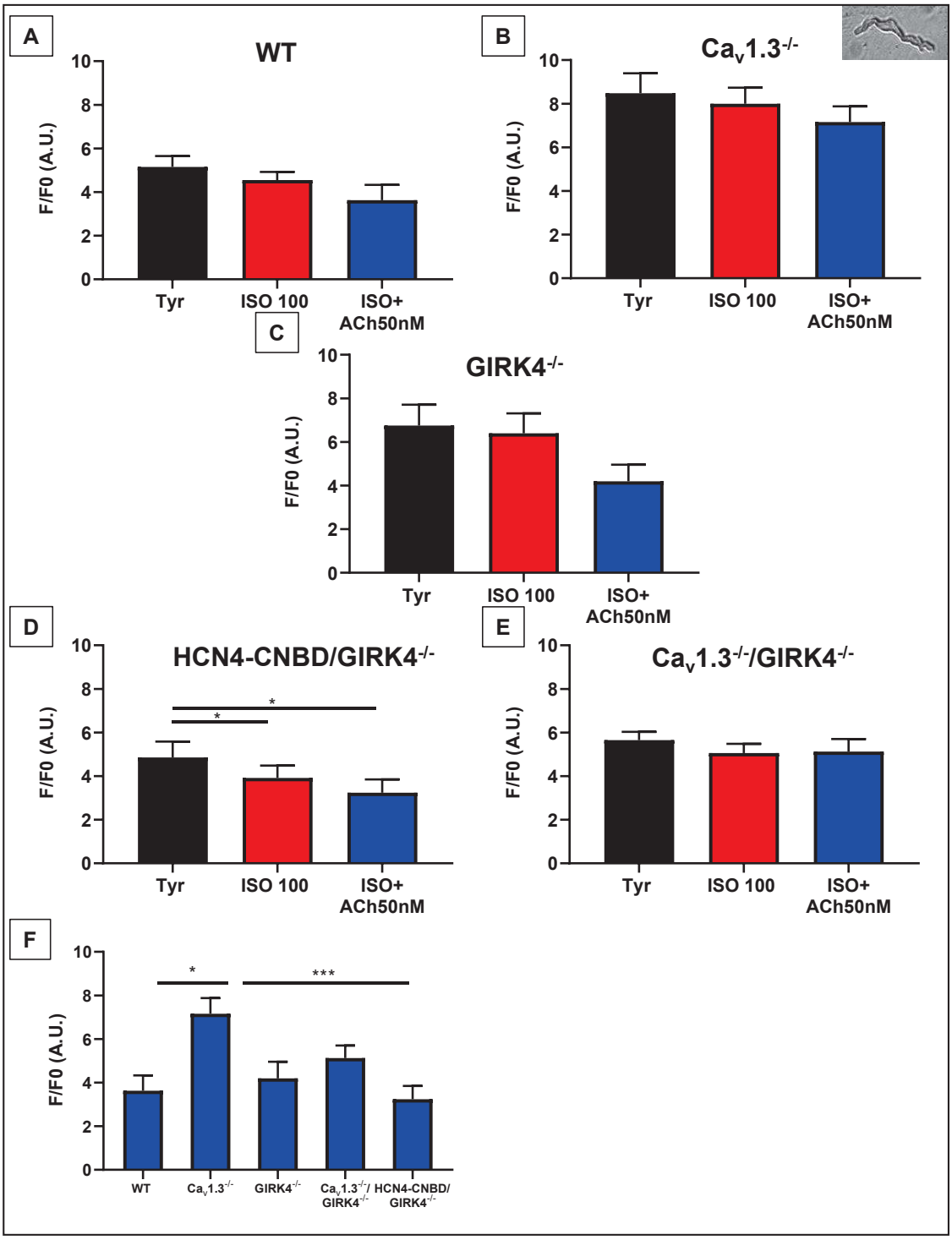


Figure 63: Amplitude moyenne des transitoires calciques dans la condition ISO et ACh pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). F : Résumé des moyennes de l'amplitude des transitoires calciques dans la condition ISO et ACh. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey*

La réponse du courant diastolique à la régulation cholinergique

La modulation de la fréquence de l'activité spontanée est induite par des changements du courant net qui traverse la membrane plasmique au cours de la dépolarisation. Ce courant est nommé « courant diastolique ».

Pour mieux comprendre les bases de nos résultats, nous avons étudié les variations du courant diastolique afin d'observer les causes d'une diminution significative de la régulation cholinergique. Pour cela, un potentiel d'action est enregistré au préalable et utilisé comme signal de voltage clamp aux cellules isolées de NSA des génotypes testés avec la technique de patch-clamp en configuration voltage-clamp. Le courant enregistré dans l'intervalle de potentiels correspondant à la dépolarisation diastolique est alors défini comme le courant diastolique.

Ces expérimentations ont été effectuées en configuration d'antagonisme accentué.

Tout d'abord, en condition contrôle, l'intégrale de temps du courant diastolique des cellules isolées du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ est réduit par rapport au souris WT, $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (Figure 64, B-E).

Ensuite concernant l'effet de l'isoprénaline, pour chacune des souris étudiées ici, WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$, l'intégrale de temps du courant diastolique dans cette condition expérimentale est statistiquement plus grande pour chacun des génotypes, ce qui se corrèle à l'augmentation de la fréquence observé sur les cellules isolées.

La concentration d'acétylcholine de 50 nM a significativement réduit l'intégrale de temps du courant diastolique des souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$ et $GIRK4^{-/-}$. Ces résultats sont cohérents avec l'effet drastique de l'acétylcholine à cette dose sur la fréquence des potentiels d'action pour les souris WT et $Ca_v1.3^{-/-}$. Cependant, les cellules des souris $GIRK4^{-/-}$, malgré une réduction de l'intégrale de temps du courant, montrent une difficulté notable à retrouver la valeur de la condition contrôle (Figure 64, B-E).

Cependant, le courant diastolique des cellules isolées du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ se montrent insensible à cette concentration d'acétylcholine, et ne parvient pas à réduire

l'augmentation de courant due à la stimulation adrénergique. Ce résultat est cohérent avec l'observation précédente sur cœur isolé *$Ca_v1.3^{-/-}$/Girk4$^{-/-}$* dont la fréquence est insensible à l'acétylcholine. Il est aussi cohérent avec une précédente publication de l'équipe. En effet, le courant diastolique des cellules du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ ne répondait pas à l'acétylcholine, même en l'absence de stimulation adrénergique (Mesirca et al. 2016b).

Cette insensibilité provoque alors en condition d'antagonisme accentué, une intégrale de temps du courant diastolique des souris GIRK4$^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ statistiquement plus grande que pour les souris WT et $Ca_v1.3^{-/-}$ (Figure 64 F).

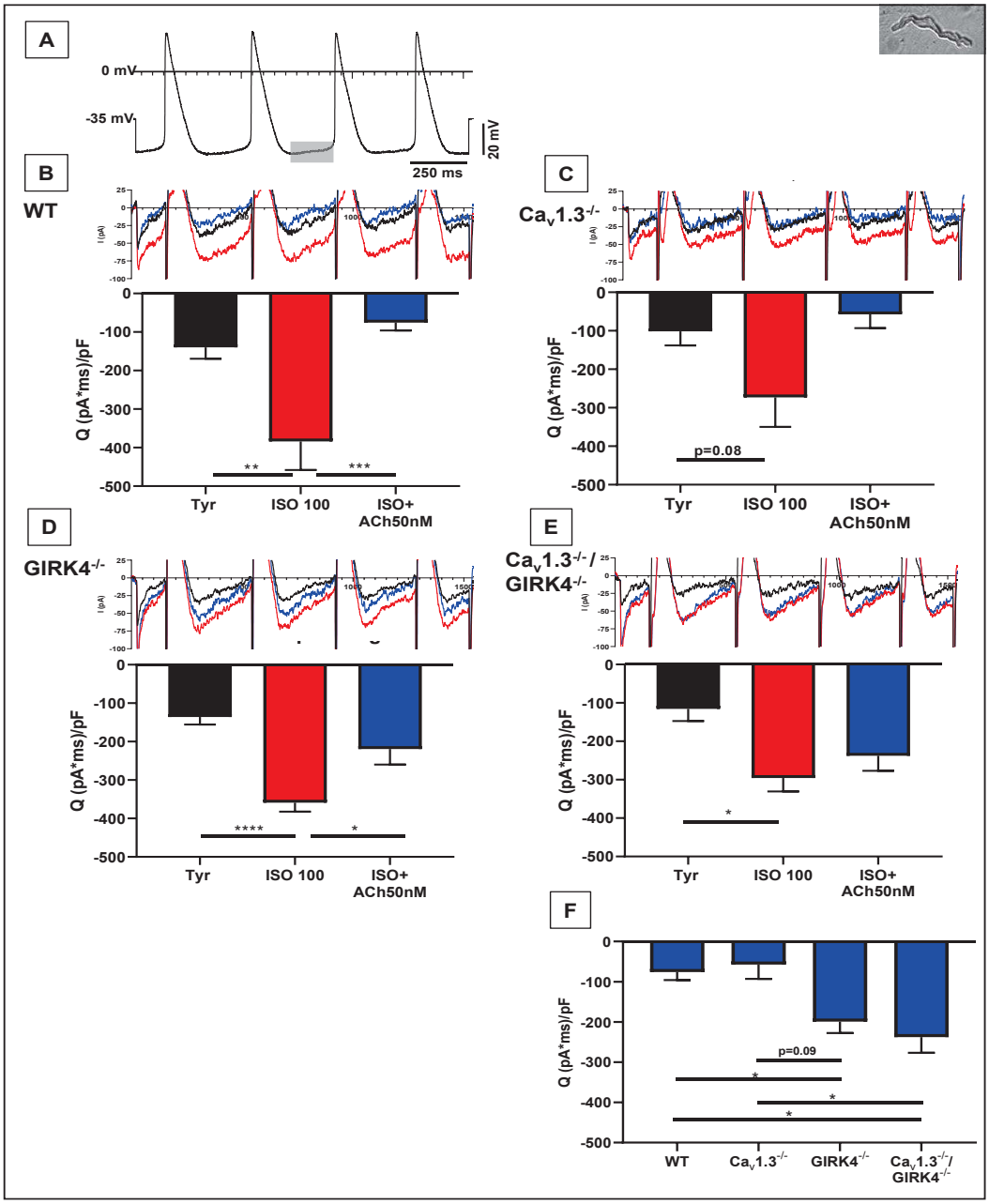


*Figure 64:Courant diastolique des cellules isolées du NSA des souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$. Tracés exemples (B, C, D, E, figure du haut) et moyennes des intégrales de temps (B, C, D, E, figure du bas) mesurées entre le voltage correspondant au potentiel diastolique maximum (-61 mV) et le seuil du potentiel d'action suivant (-42 mV) d'un échantillon de potentiel d'action SAN de souris utilisé comme commande de voltage-clamp. A : Protocole de voltage clamp. Le courant est mesuré en condition contrôle, après perfusion d'ISO à 0.1 µM puis d'ISO en présence de 0.05 µM d'ACh pour B : n=6 (WT), C : n=6 ($Ca_v1.3^{-/-}$), D : n=12 ($GIRK4^{-/-}$) et E : n=10 ($Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$). F : Résumé des moyennes des intégrales de temps du courant diastolique dans la condition ISO et ACh *P < 0.05; ***P < 0.001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey.*

Le courant calcique de type L et la régulation cholinergique

Le canal $Ca_v1.3$ est responsable de 69% du courant calcique de type L dans la cellule pacemaker de souris (Mangoni et al. 2003). Alors l'enregistrement du courant calcique de type L des cellules isolées du NSA de souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (et WT pour la comparaison) permet d'étudier le comportement du canal $Ca_v1.3$ lors de la régulation cholinergique.

Ces résultats ont été enregistrés avec la technique de patch-clamp en configuration voltage-clamp et en configuration d'antagonisme accentué.

Lors de l'étude du courant calcique de type L dans ces cellules pacemaker après une stimulation adrénergique, on observe que la concentration d'acétylcholine de 50 nM ne modifie pas significativement ce courant dans les cellules de NSA de souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (Figure 65, B, E), cependant cette première dose a un effet réducteur de 27% sur I_{CaL} dans les cellules pacemaker de génotype WT (Figure 65, A,D).

La seconde dose de 1 µM, réduit significativement le courant I_{CaL} des cellules du NSA de souris WT de 74% et de $Ca_v1.3^{-/-}$ de 61% avec un effet dose dépendant qui augmente de respectivement 58 et 34% avec une concentration plus élevée d'acétylcholine.

Le courant calcique de type L résiduel des cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ est généré par l'isoforme $Ca_v1.2$ et peut donc être réduit par l'acétylcholine après une stimulation adrénergique.

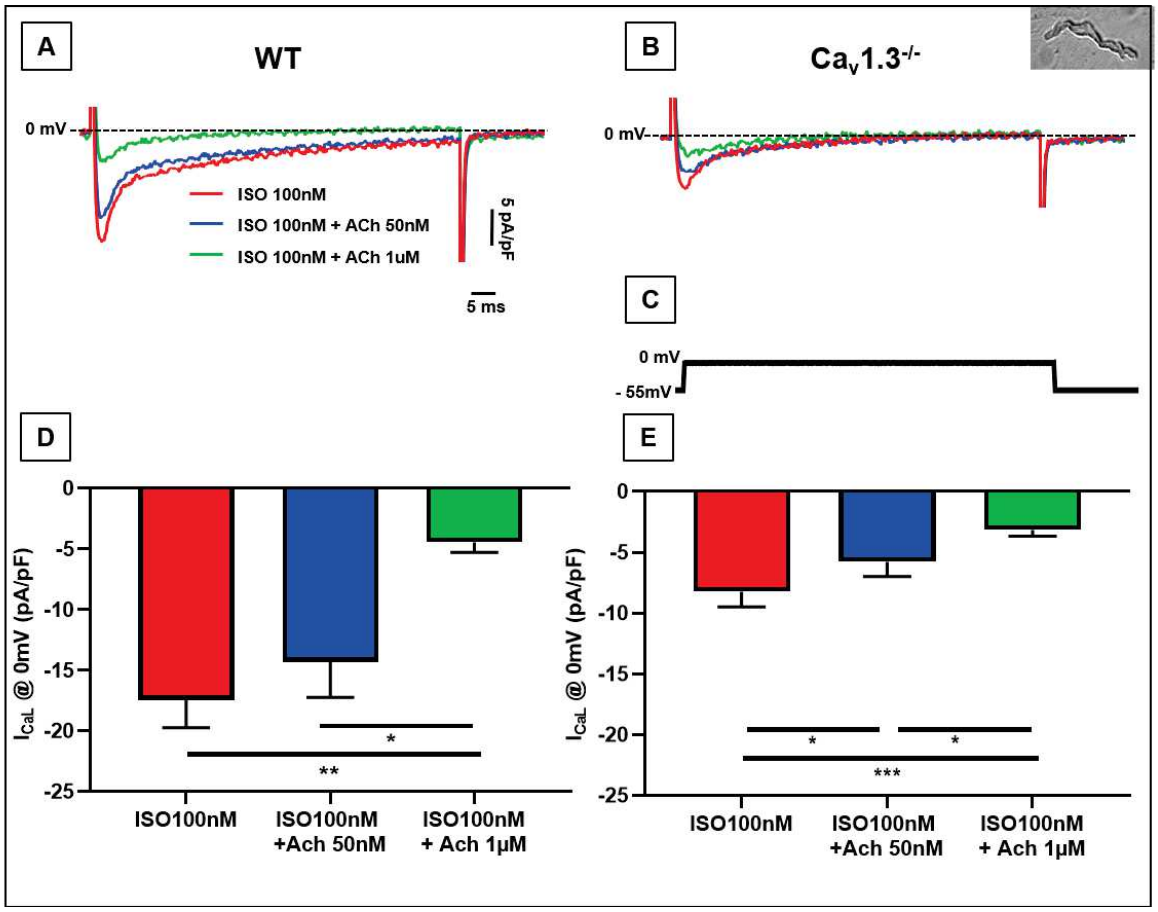


Figure 65: Enregistrement du courant calcique de type L (ICaL) avec un protocole dépolarisant de voltage-clamp à partir d'un potentiel de maintien de -55 qui permet l'activation de ce courant. Tracé exemple de ICaL sur des cellules pacemaker WT (A) et $Ca_v1.3$-/- (B). C : Protocole de dépolarisation utilisé en voltage-clamp. Moyenne des densités du courant I_{CaL} dans les cellules isolées du NSA en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM pour n=4 cellules WT (D), n=6 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (E). *P < 0.05; ***P < 0.001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.*

Cependant, la courbe courant voltage met en exergue un courant I_{CaL} statistiquement insensible à des concentrations d'acétylcholine de 50 nM et 1 µM dans les cellules pacemaker des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ dans l'intervalle de potentiels correspondant à la dépolarisation diastolique (Figure 67). En effet, à la première dose d'acétylcholine de 50 nM, I_{CaL} est réduit de 27% dans les cellules isolées du NSA des souris WT contre seulement 14% pour les cellules $Ca_v1.3^{-/-}$. Une

concentration de 1 µM permet d'atteindre 58% de réduction pour les cellules WT et 34% pour les cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (Figure 66).

Alors, bien que le courant I_{CaL} des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ dans le NSA puisse être réduit par l'acétylcholine après une stimulation adrénergique, les concentrations nécessaires à une réduction significative de ce courant sont de l'ordre du supra-physiologique. Ce qui suggère qu'à de plus faible dose, aucune réduction de I_{CaL} n'aurait pu être observée. Cela indique que la seconde composante du courant I_{CaL} de la cellule pacemaker de souris, c'est-à-dire $Ca_v1.2$ soit insensible à ces concentrations d'acétylcholine.

Cependant une réserve existe quant à cette conclusion, de par la forte concentration d'isoprénaline utilisées.

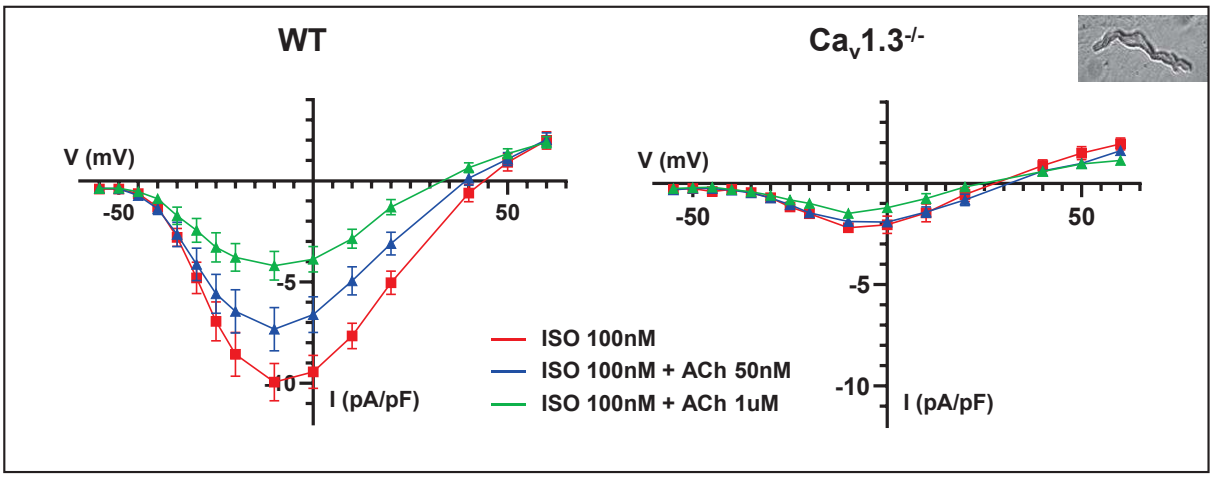


Figure 66: Moyenne de la relation courant-voltage de I_{CaL} de cellules pacemakers de souris WT (n=7) et $Ca_v1.3$-/- (n=3) en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne.

Mais lorsque l'on observe I_{CaL} pour les cellules isolées du NSA des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ dans le volet de la dépolarisation diastolique, à savoir entre -55 et -35 mV, l'acétylcholine n'y a plus aucun effet contrairement à ce que présente les cellules isolées du NSA des souris WT (Figure 67). Cela place donc $Ca_v1.3$ dans un rôle important d'acteur de la régulation cholinergique durant la dépolarisation diastolique.

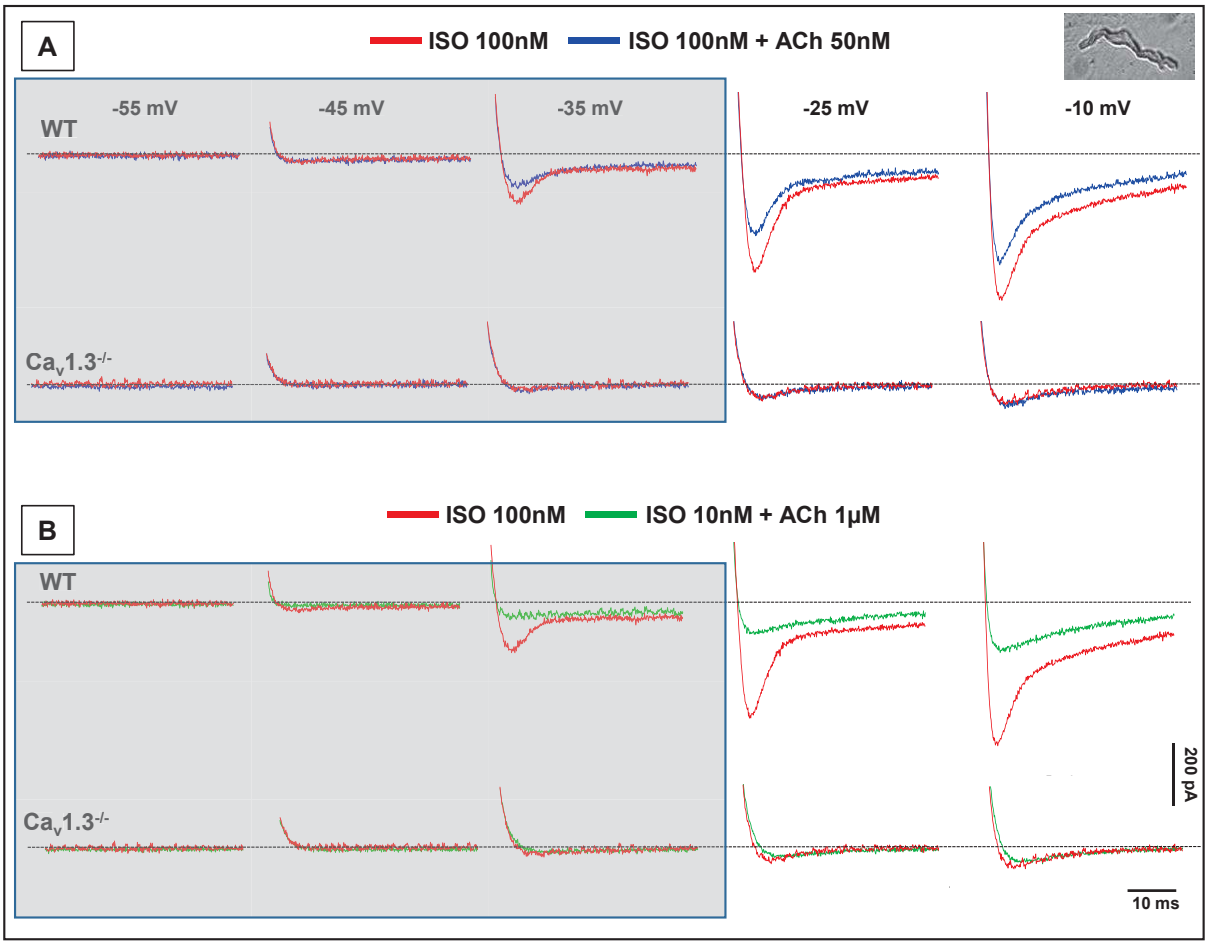


Figure 67: Enregistrement effectué sur des cellules isolées du NSA en condition de stimulation β-adrénergique avec de l'ISO à 0.1 µM (trace exemple en rouge) puis après une perfusion d'ISO et d'ACh 0.05 µM (trace exemple en bleu) ou avec de l'ISO et d'ACh 1 µM (trace exemple en vert) des cellules pacemaker de souris WT et $Ca_v1.3^{-/-}$. Encadré gris : gamme de voltage de la dépolarisation diastolique.

Résultats supplémentaires

Etude de la fréquence cardiaque *in vivo*

En condition basale *in vivo*, les différents génotypes présentes des fréquences cardiaques différentes. On observe une fréquence cardiaque de … chez les souris WT, de …. chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, de … chez les souris $GIRK4^{-/-}$ et de …chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$.

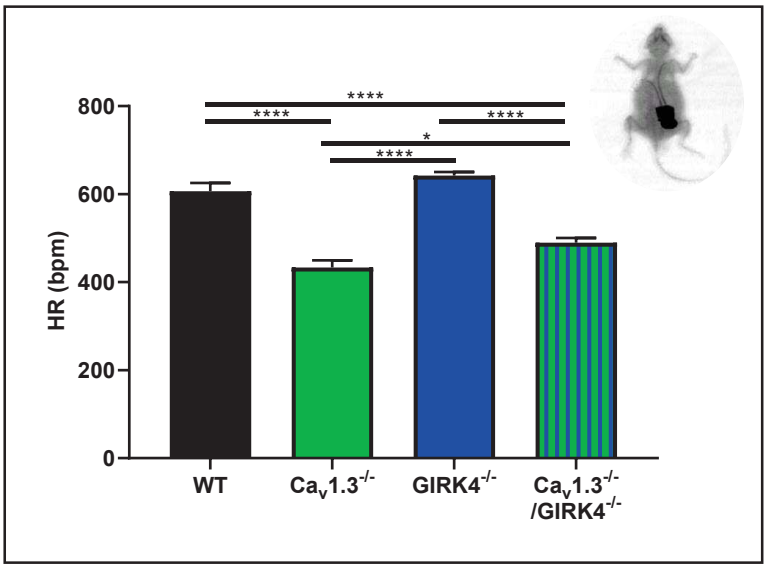


*Figure 68: Moyenne des fréquences cardiaques en baseline pour 6 souris WT, 8 souris $Ca_v1.3^{-/-}$, 6 souris $GIRK4^{-/-}$ et 7 souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett.*

Effet d'une stimulation adrénergique sur ECG *ex vivo*

Une perfusion de 100 nM d'Isoprénaline sur les cœurs isolés perfusés a augmenté de façon significative la fréquence atriale des différents génotypes testés. L'augmentation de la fréquence atriale par rapport à la fréquence basale a été de …% pour les cœurs isolés des souris WT, de …% pour les cœurs isolés des souris HCN4-CNBD, de …% pour les cœurs isolés des souris $Ca_v1.3^{-/-}$, de …% pour les cœurs isolés des souris $GIRK4^{-/-}$, de …% pour les cœurs isolés des souris HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ et de …% pour les cœurs isolés des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/ $GIRK4^{-/-}$.

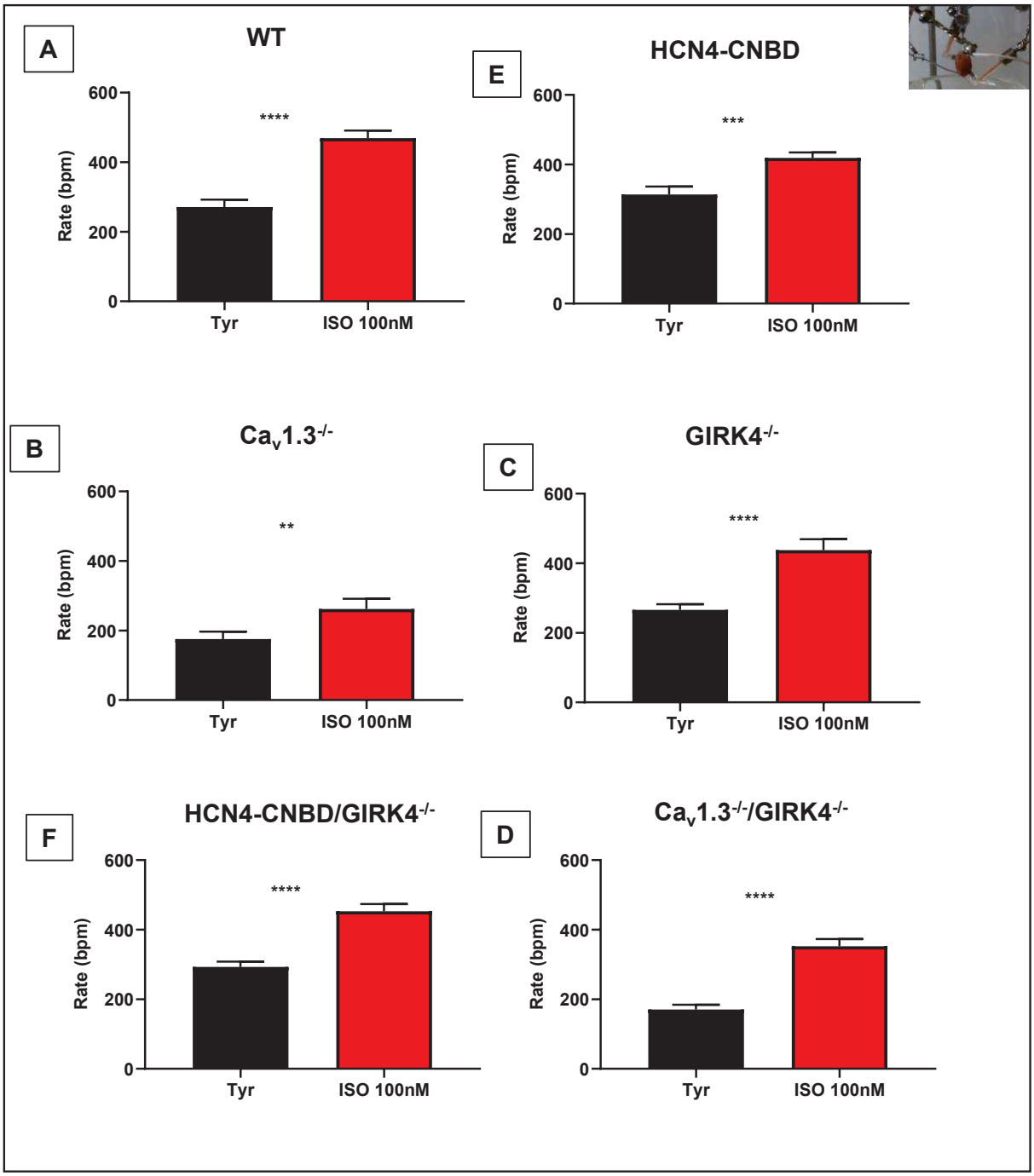


*Figure 69: Moyenne de l'effet de l'ISO sur la fréquence atriale ex vivo sur N=15 cœurs WT, N=11 cœurs HCN4-CNBD, N=11 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$, N=13 cœurs $GIRK4^{-/-}$, N=13 cœurs HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$, et N=12 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : T-test non appareillé*

Effet d'une stimulation adrénergique sur la fréquence des potentiels d'action.

L'utilisation d'une solution de 100 nM d'Isoprénaline sur les cellules isolées de NSA a augmenté de façon significative la fréquence des potentiels d'action dans les différents génotypes testés. L'augmentation de la fréquence des potentiels d'action par rapport à la fréquence en condition contrôle a été de …% pour les cellules isolées des souris WT, de …% pour les cellules isolées des souris HCN4-CNBD, de …% pour les cellules isolées des souris $Ca_v1.3^{-/-}$, de …% pour les cellules isolées des souris $GIRK4^{-/-}$, de …% pour les cellules isolées des souris HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ et de …% pour les cellules isolées des souris $Ca_v1.3^{-/-}$/ $GIRK4^{-/-}$.

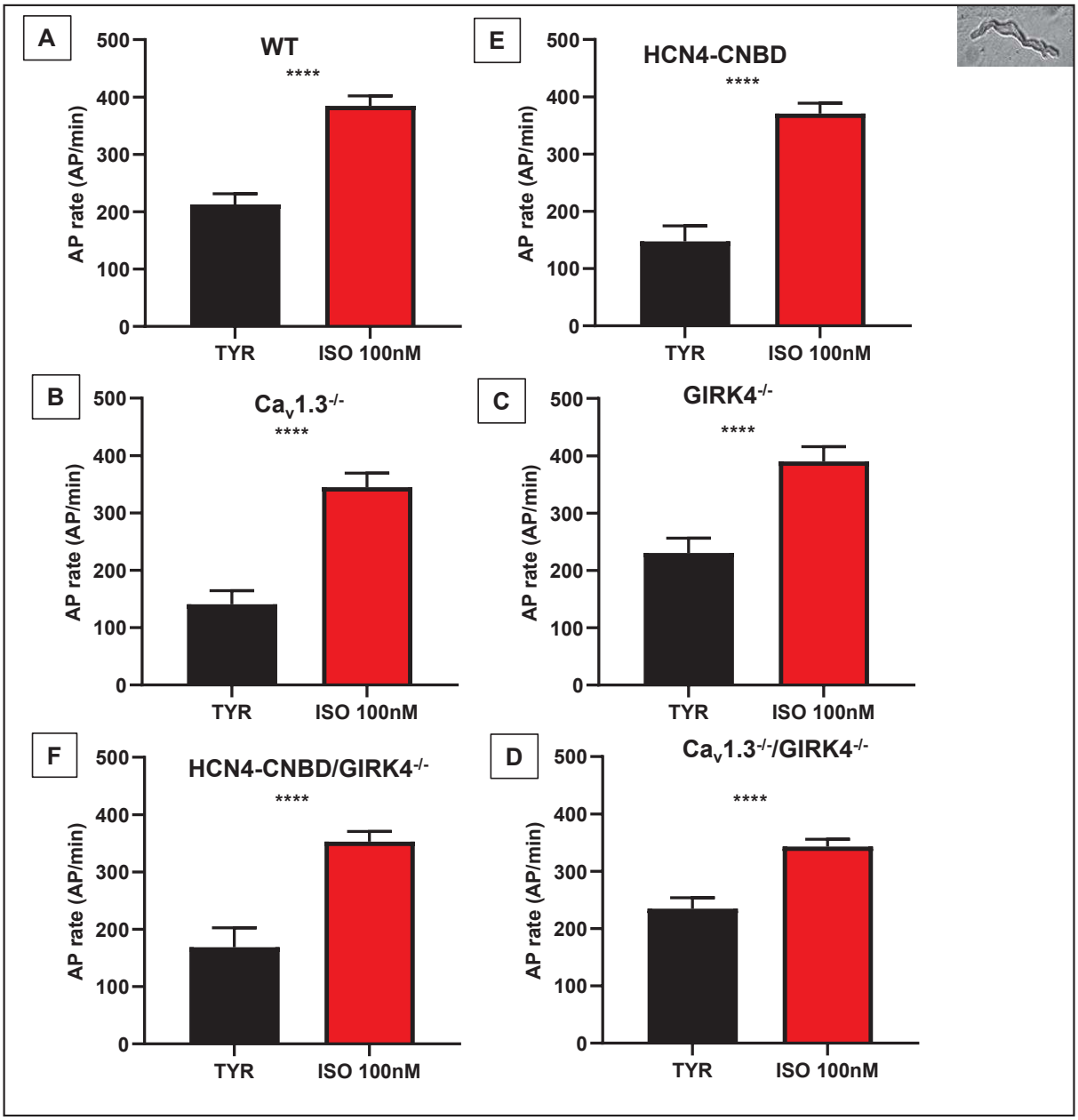


*Figure 70: Etude de l'automatisme cardiaque par la fréquence des potentiels d'action entre la condition contrôle et l'ISO pour (en condition contrôle) n=9 cellules WT, n=10 cellules HCN4-CNBD, n=7 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$, n=7 cellules $GIRK4^{-/-}$, n=5 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$, et n=10 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : T-test non appareillé*

Effet d'une stimulation adrénergique sur le courant calcique de type L

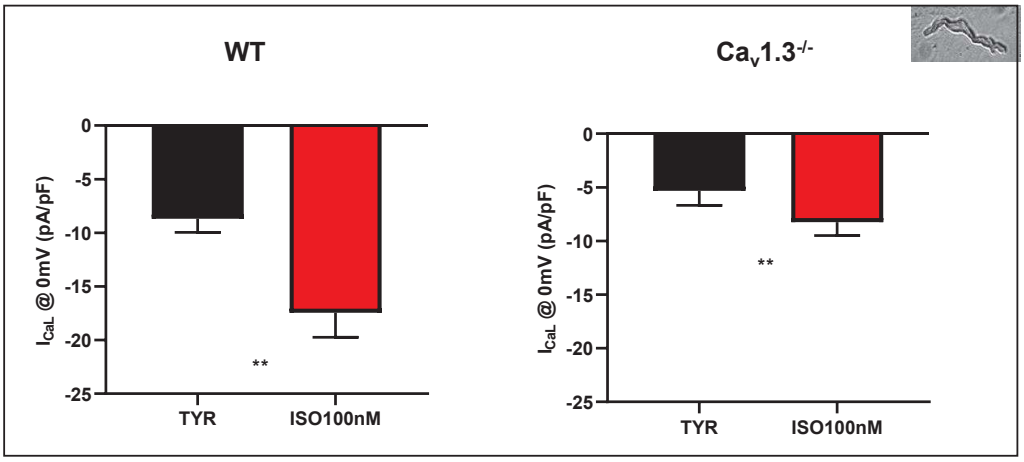


*Figure 71: Moyenne des densités du courant I_{CaL} dans les cellules isolées du NSA en condition contrôle et avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM pour n=4 cellules WT, n=6 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$. *P < 0.05. Test statistique : T-test appareillé*

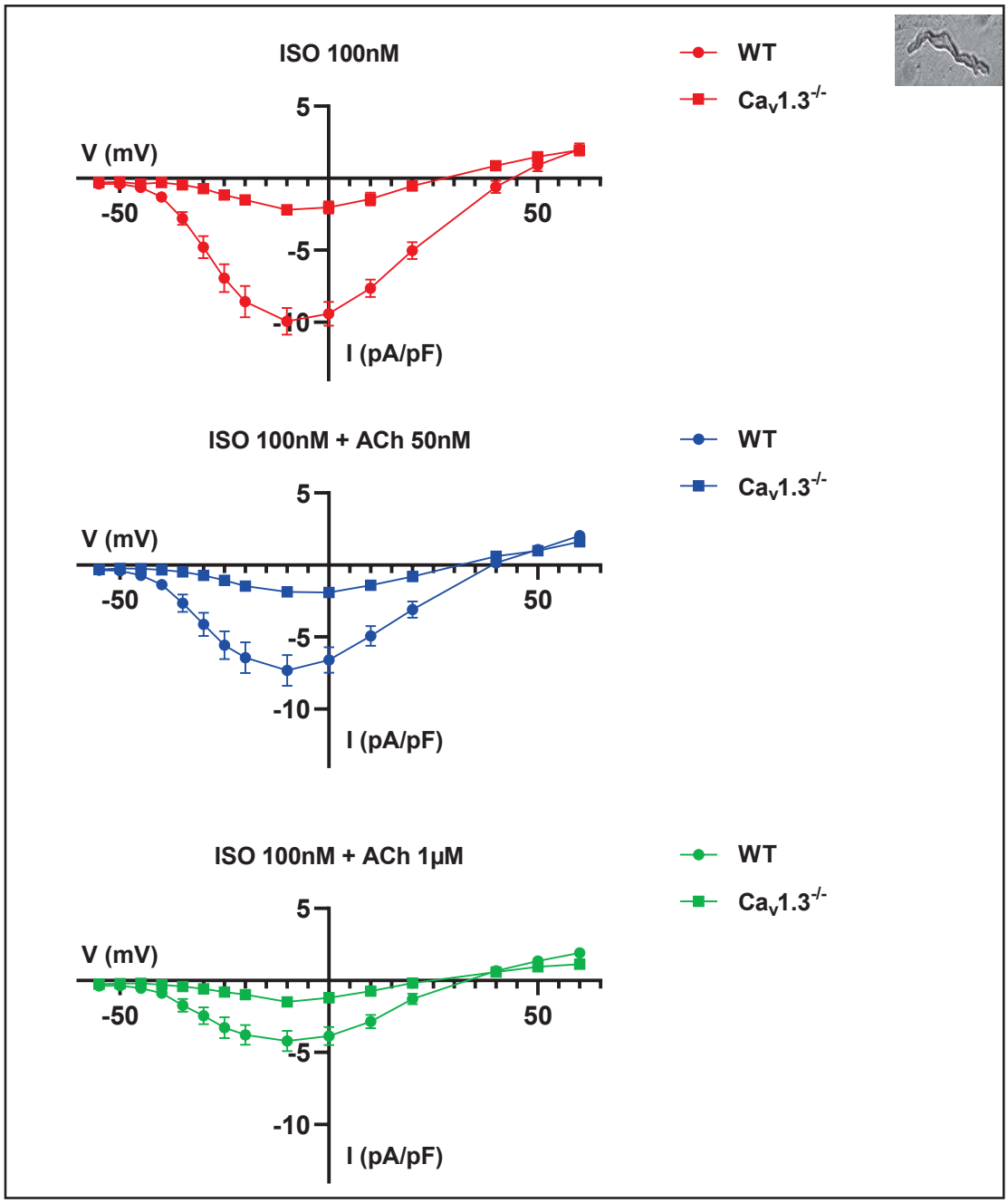


Figure 72: Moyenne de la relation courant-voltage de I_{CaL} de cellules pacemakers de souris WT (n=7) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (n=3) en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne

Discussion

Les mécanismes ioniques qui sont à la base de la régulation de l'automatisme cardiaque par le système nerveux parasympathique ne sont pas encore entièrement élucidés. En particulier, les rôles respectifs des canaux ioniques tels que $Ca_v1.3$, HCN4 et I_{KACh} sont encore source de débat. . La figure 49 montre l'importance des canaux $Ca_v1.3$ et HCN4 dans la régulation sympathique de la fréquence cardiaque. Le système parasympathique fait intervenir à la fois la voie directe dépendante de l'activation de I_{KACh} via les G protéines et la voie « indirecte » de dégradation de l'AMPc, qui a comme effecteurs les canaux ioniques impliqués dans la voie adrénergique. Ceci justifie l'importance d'étudier le rôle de I_f et I_{CaL} dans la régulation cholinergique.

De plus, une précédente étude au sein même de l'équipe a permis de faire la lumière sur un phénomène de sauvetage par la délétion de I_{KACh} de la fréquence cardiaque dans les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ qui sont un modèle important de la dysfonction sinusale (« Sick Sinus Syndrome » ou SSS). Les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présentent une forte bradycardie associée à des arythmies atriales et des troubles de la conduction atrio-ventriculaires. Chez ces souris, l'ablation génétique des canaux GIRK4, supprime le courant I_{KACh} et permet de prévenir tous les symptômes précédemment cités qui miment le SSS (Mesirca et al. 2016b).

Les résultats de cette étude ont permis de démontrer que I_{KACh} exerce un rôle physiopathologique important. D'une part, I_{KACh} contribue à la régulation parasympathique de la fréquence cardiaque en conditions physiologiques et d'autre part elle est responsable de de la bradycardie pathologique lors d'une perte de fonction des canaux ioniques impliqués dans la génération de l'automatisme (Bidaud et al. 2020). Ces points mettent en avant l'importance d'étudier I_f et I_{CaL} dans la régulation de l'automatisme cardiaque par le système nerveux parasympathique ainsi que leur interaction avec I_{KACh}, acteur majeur de la régulation cholinergique dans le NSA.

L'étude des voies cholinergique et adénosinergique *in vivo*

L'exploration fonctionnelle *in vivo* permet d'étudier la fréquence cardiaque ainsi que sa régulation par les systèmes sympathique et parasympathique dans le système intégré. Cette étude avait pour objectif de déterminer si l'ablation de $Ca_v1.3$ pouvait avoir un impact sur la voie cholinergique et adénosinergique et notamment lors de l'ablation concomitante de GIRK4.

L'utilisation du Carbachol, un agoniste du récepteur M2, permet de mettre en lumière l'importance de I_{KACh} dans la voie parasympathique. En effet, l'ablation génétique bloque l'effet chronotrope négatif sur la fréquence cardiaque par cette voie, même lorsque les effecteurs de la voie indirecte dépendante de l'AMPc $Ca_v1.3$ et HCN4 sont encore fonctionnels (Figure 50). En effet comme discuté dans l'introduction, l'activation des récepteurs de la voie cholinergique permet la réduction de la fréquence cardiaque par l'ouverture des canaux GIRK1/4, la voie directe, mais passe également par la voie AMPc dépendante, la voie indirecte, impliquant I_{CaL}, l'activation AMPc-dépendant de I_f ainsi que la dynamique calcique intracellulaire.

Il est intéressant de noter que la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ ne baisse pas significativement à la dose plus faible de Carbachol. En effet bien que le résultat ne soit pas significatif, la tendance à la réduction de la fréquence cardiaque pour les souris WT est nettement plus importante. Ce n'est que la seconde dose de Carbachol qui permet une importante diminution de la fréquence cardiaque chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$. Ce résultat laisse penser que c'est à une faible concentration de Carbachol que $Ca_v1.3$ pourrait jouer un rôle dans la régulation cholinergique.

L'agoniste du récepteur A1 CCPA, montre un effet bradycardisant bien plus important que le Carbachol. Son utilisation met également en avant une forte interaction entre la voie adénosinergique et la voie AMPc-dépendante de la régulation du système nerveux parasympathique. En effet, malgré l'absence du courant I_{KACh}, les souris GIRK4$^{-/-}$ ont subi une forte réduction de leur fréquence cardiaque dans cette condition expérimentale. Cependant ici, l'ablation concomitante de I_{KACh} et de I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$ empêche tout effet bradycardisant du CCPA, plaçant ainsi $Ca_v1.3$ dans un rôle crucial de la voie AMPc-dépendant de la régulation de l'effet chronotrope négatif induit par l'adénosine via les récepteurs A1 (Figure 51).

L'utilisation de l'Hexamethonium seul n'a, pour les quatre génotypes testés, eu aucun effet visible sur la fréquence cardiaque. L'Atropine et le Propranolol seuls ou associés à l'Hexamethonium ont montré des tracés similaires pour chaque génotype. Dans ces conditions, le moyen adéquat de s'affranchir le plus possible des catécholamines circulantes est donc l'utilisation de l'Atropine et du Propranolol, plus efficaces à bloquer les récepteurs à la surface des cellules. Cependant son utilisation associée au CCPA montre, pour les quatre génotypes, une tendance à accentuer l'effet bradycardisant du CCPA (Figure 53-56, C et D).

En condition *ex vivo*, l'ablation concomitante de $Ca_v1.3$ et GIRK4 bloque la régulation cholinergique après une stimulation β-adrénergique sur cœur entier

Bien que cette condition expérimentale ne permette pas de s'affranchir complètement des effets du système nerveux autonome, l'enregistrement de l'ECG sur cœur isolé-perfusé rend possible l'étude de la fréquence atriale intrinsèque des cœurs de souris sans l'utilisation de drogues supplémentaires.

Lors de cette expérience, il est important de noter que, après stimulation β-adrénergique, la première concentration d'Acétylcholine testée a permis une réduction significative de la fréquence atriale des souris HCN4-CNBD, et $GIRK4^{-/-}$, mais pas des souris $Ca_v1.3^{-/-}$, ce qui montre que $Ca_v1.3$ est important pour induire une réduction de la fréquence à la concentration sous maximale d'Acétylcholine. L'augmentation de la concentration en Acétylcholine met alors en jeu le rôle de I_{KACh}, en effet chaque génotype ayant le canal GIRK1/4 fonctionnel présente une forte réduction de la fréquence atriale.

Enfin, le rôle de l'association entre $Ca_v1.3$ et GIRK1/4 est mis en évidence. En effet lorsque que l'on observe l'ablation génétique de I_{KACh} ou I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$, l'Acétylcholine permet encore une réduction significative de la fréquence atriale, y compris en l'absence de I_{KACh} et de l'activation AMPc-dépendante de HCN4 (Figure 57 E). Ce n'est que lors de l'ablation concomitante de I_{KACh} et I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$ que l'Acétylcholine ne permet pas de réduire la fréquence atriale (Figure 57 F).

Le site d'initiation de l'automatisme cardiaque dans le NSA se déplace grâce à I_{KACh}

L'utilisation de l'Acétylcholine permet de mettre en évidence le sauvetage des conséquences de l'absence de $Ca_v1.3$ par l'ablation de GIRK4. En effet, l'absence de $Ca_v1.3$ montre une fréquence de dépolarisation faible et désorganisée et une forte sensibilité à l'Acétylcholine. Lorsque l'absence de $Ca_v1.3$ est associée à l'ablation génétique de GIRK4, pour ces souris la fréquence de dépolarisation est significativement augmentée, régulière et moins sensible à l'Acétylcholine.

Ici, l'absence de I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$ n'empêche pas l'action de l'Acétylcholine sur la première concentration, la sensibilité de $Ca_v1.3$ à de faibles concentrations d'Acétylcholine semble donc importante dans le cas d'une stimulation β-adrénergique au préalable. La encore, l'absence de I_{KACh} empêche l'augmentation progressive de la réduction de la fréquence atriale entre les deux concentrations d'Acétylcholine. L'activation du courant I_{KACh} lors de la régulation cholinergique semble donc intervenir à des fortes concentrations d'Acétylcholine, avec ou sans stimulation β-adrénergique.

L'absence de déplacement important pour les souris GIRK4$^{-/-}$ et HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ indique le rôle essentiel du courant I_{KACh} dans le déplacement du site d'initiation lors de la régulation cholinergique. Cependant les souris $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$ présentent elles de fort déplacement de ce site d'initiation sur les tissus sinusaux. Ce résultat provient de l'ablation de $Ca_v1.3$, qui perturbent fortement le site d'initiation de l'activité pacemaker.

Les dysfonctions sinusales dues à l'ablation de $Ca_v1.3$ peuvent être sauvées par l'ablation concomitante de GIRK1/4

Cette première expérience d'enregistrement de potentiels d'action de cellules pacemaker en condition d'antagonisme accentué met la encore en lumière l'importance de I_{KACh} dans l'automatisme cardiaque et notamment sa régulation par le système nerveux parasympathique. En effet sa présence, notamment pour les cellules pacemaker des souris HCN4-CNBD et $Ca_v1.3^{-/-}$, arrête la génération de potentiel d'action dès la première concentration d'Acétylcholine testée. Cependant, lorsque ces mutations sont associées à l'ablation de I_{KACh}, l'effet puissant de l'Acétylcholine est freiné et l'activité pacemaker ne s'arrête pas même à la plus forte dose d'Acétylcholine.

La libération locale de calcium par le réticulum sarcoplasmique n'est pas corrélée ou couplée à l'automatisme au cours de la régulation cholinergique en antagonisme accentué

L'étude de la dynamique calcique intracellulaire dans le cadre de l'antagonisme accentué et de l'implication de GIRK1/4, HCN4 et $Ca_v1.3$ dans la régulation cholinergique de l'activité pacemaker ne montre pas de lien entre ces éléments et donc peu de lien avec le « Ca^{2+} clock ». En effet l'activité des transitoires calciques est réduite en présence d'Acétylcholine y compris pour les cellules pacemakers des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ qui, à la même dose d'Acétylcholine, voyaient la fréquence des potentiels d'action s'arrêter complètement. On peut cependant noter que pour les cellules des souris GIRK4$^{-/-}$, la réduction de la fréquence des transitoires calciques est plus importante que pour les cellules des souris HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$ ou bien encore $Ca_v1.3^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$. Cette différence peut provenir de la voie indirect AMPc-dépendant de la régulation cholinergique dans la cellule pacemaker.

Les libérations locales de calcium quant à elles, ne sont plus liées à la fréquence des transitoires calciques, alors que l'on aurait pu présumer que leur nombre diminuerait lors de l'augmentation de la fréquence des transitoires calciques, et inversement. En revanche ce que les résultats montrent c'est (i) une relation inverse entre le nombre des évènements de libérations locales de Ca^{2+} et la fréquence des transients et (ii) l'importance des canaux $Ca_v1.3$ dans la génération de ces libérations locales. En effet, nous pouvons remarquer que le nombre de libérations locales est réduit dans les cellules *$Ca_v1.3^{-/-}$* et *$Ca_v1.3^{-/-}$/Girk4$^{-/-}$* et ceci, alors que la fréquence spontanée des cellules des deux génotypes soit très différente en condition basale et sous activation cholinergique.

L'amplitude des transitoires calciques, là encore, ne montrent aucun lien avec leur fréquence. Cependant ce résultat pourrait être biaisé par la fréquence d'activité très faibles de certains génotypes, et notamment des cellules *$Ca_v1.3^{-/-}$*. Ces cellules ayant un rythme lent, le réticulum sarcoplasmique aurait plus de temps pour se charger entre un battement et l'autre. En plus, le travail de l'équipe a montré que les canaux $Ca_v1.3$ sont responsables d'une libération de Ca^{2+} au cours de la phase diastolique (Baudot et al. 2020 ; Torrente et al. 2016). La perte de $Ca_v1.3$ dans les cellules *$Ca_v1.3^{-/-}$* provoque donc une accumulation de Ca^{2+} dans le réticulum à cause de la diminution de libération diastolique.

Le courant diastolique est impacté par l'ablation de GIRK4 et $Ca_v1.3$

Afin de comprendre l'interaction entre le courant I_{CaL} porté par $Ca_v1.3$ et I_{KACh}, le courant diastolique des cellules pacemaker permet de mesurer la réserve de dépolarisation de la cellule, c'est-à-dire la quantité de courant net entrant que la cellule génère pour initier la dépolarisation diastolique et le potentiel d'action. Si le courant net est entrant, alors le potentiel de membrane dépolarisera à une vitesse directement proportionnelle au courant. Si le courant net est sortant, l'automatisme va s'arrêter. En effet, l'activation de I_{KACh} ralentie la fréquence car elle réduit la quantité du courant entrant disponible et déplace l'équilibre du courant diastolique en direction sortante. De même, la réduction de la concentration d'AMPc réduit le courant entrant en diminuant l'amplitude des courants $Ca_v1.3$ et I_f, tout comme l'ablation de $Ca_v1.3$. Nos résultats montrent que, dans notre système l'activation d'I_{KACh} ralentie la fréquence car elle réduit le courant diastolique. Toutefois, quand I_{KACh} et $Ca_v1.3$ sont inactivés dans les cellules $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$, la perte de ces deux mécanismes réduit drastiquement la capacité de l'Acétylcholine à ralentir l'activité pacemaker. Ceci démontre que la baisse de l'AMPc intracellulaire suite à l'activation des récepteurs M2 ne peut pas ralentir efficacement l'activité pacemaker via le Ca^{2+} clock et le courant I_f en l'absence des canaux $Ca_v1.3$. Ceci permet de formuler l'hypothèse de l'existence d'une interaction fonctionnelle les canaux $Ca_v1.3$ et HCN4, car le courant I_f devrait pouvoir ralentir la fréquence suite à l'activation des récepteurs M2 même en l'absence des canaux $Ca_v1.3$ et I_{KACh}.

Les deux composantes de I_{CaL} et leur différence de sensibilité à l'Acétylcholine jouent un rôle dans la régulation cholinergique

Les cellules pacemaker des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ révèlent un courant I_{CaL} encore sensible à l'acétylcholine, et qui se réduit de façon significative en sa présence après une stimulation β-adrénergique. Mais encore une fois, ce n'est pas la plus faible concentration d'Acétylcholine testée qui va permettre de réduire le courant résiduel I_{CaL}.

Le courant I_{CaL} est porté par deux canaux calciques dans les cellules pacemaker : $Ca_v1.3$, qui est le plus grand contributeur, et $Ca_v1.2$. Les résultats de l'absence de réduction significative du courant par l'Acétylcholine aux premières concentrations testés lors des expérimentations indique alors une différence de sensibilité de ces deux canaux à l'Acétylcholine : de faibles doses d'Acétylcholine permettraient de réduire l'activité de $Ca_v1.3$ tandis que $Ca_v1.2$ serait sensible aux plus fortes concentrations.

De plus, en l'absence de $Ca_v1.3^{-/-}$, le léger effet de la réduction du courant I_{CaL} n'est présent qu'à partir de -35 mV, un voltage favorable à l'activité de $Ca_v1.2$ et non $Ca_v1.3$. Or, lorsque $Ca_v1.3$ est présent, c'est à partir de -45 mV qu'on décèle les premiers effets de l'Acétylcholine sur ce courant, voltage en adéquation avec l'ouverture de $Ca_v1.3$, et peu de $Ca_v1.2$.

Ces observations ont des conséquences importantes. Tout d'abord, les travaux précédents sur le rôle de I_{CaL} dans la régulation cholinergique de l'activité pacemaker ont assigné un rôle mineur à ce courant et donné à I_f ou au Ca^{2+} clock le rôle prépondérant. Toutefois, les mesures sur I_{CaL} ont été effectuées à partir d'un potentiel de repos de -35 mV (Petit-Jacques et al. 1993 ; Zaza et al. 1996), un potentiel qu'inactive complétement $Ca_v1.3$ (Mangoni et al. 2003). Par conséquent, les études qui ont proposé que la régulation muscarinique de I_{CaL} est présente seulement à fortes concentration d'Acétylcholine et après stimulation par isoprotérenol se sont essentiellement concentrées sur $Ca_v1.2$. En revanche, la régulation muscarinique de $Ca_v1.2$ à forte concentration d'agoniste muscarinique pourrait expliquer l'effet chronotrope négatif *in vivo* et *ex vivo* dans le génotype $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$.

Conclusion et perspectives

Les résultats permettent de reconsidérer certains aspects des mécanismes ioniques à la base de la régulation cholinergique de l'activité pacemaker et de la fréquence cardiaque.

Les résultats confirment que I_{KACh} constitue un mécanisme très important dans la modulation de l'activité pacemaker *in vivo* et *ex vivo* par les récepteurs cholinergiques muscariniques M2. Il est important de noter que la réponse au Carbachol et au CCPA *in vivo* est fortement réduite par l'ablation génétique de Girk4. De plus, I_{KACh} est le principal responsable du déplacement du site d'origine de l'activité pacemaker dans le NSA au cours de l'activation muscarinique. Enfin, une forte activation d'I_{KACh} est capable d'arrêter l'automatisme des cellules pacemaker isolées, même en présence d'une stimulation maximale du système par l'isoprénaline. La voie dite « directe » de régulation dépendant de l'ouverture des canaux Girk1/Girk4 est donc très importante dans l'ensemble du mécanisme de régulation cholinergique de l'activité pacemaker. Toutefois, cette étude montre un rôle des canaux $Ca_v1.3$ dans la régulation cholinergique par la voie dite « indirecte » dépendant de l'AMPc et la PKA. D'abord, l'expression des canaux $Ca_v1.3$ est importante pour l'effet chronotrope négatif des récepteurs A1, car l'abolition conjointe d'I_{KACh} et de $Ca_v1.3$ rend les souris insensibles à l'administration de CCPA. Les canaux $Ca_v1.3$ semblent aussi être impliqués dans la régulation cholinergique *in vivo*, car la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ n'est pas sensible à la dose plus basse de Carbachol. Une autre observation importante est que le cœur isolé des souris $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$ est insensible aux doses utilisées d'acétylcholine, contrairement aux cœurs $Girk4^{-/-}$ et HCN4-CNBD/$Girk4^{-/-}$ qui montrent un effet chronotrope négatif de l'acétylcholine. Bien que nos résultats montrent le rôle des canaux $Ca_v1.3$ dans la régulation, le rôle de $Ca_v1.2$ mérite d'être étudié. En particulier, puisque les courant I_{CaL} généré par $Ca_v1.2$ est sensible à des fortes doses d'acétylcholine, ce courant pourrait contribuer à la régulation cholinergique à forte concentration d'agoniste, comme nous avons observé dans les cellules pacemaker isolées $Ca_v1.3^{-/-}/Girk4^{-/-}$. Il est important de noter que, dans certaines conditions, l'ablation conjointe de $Ca_v1.3$ et I_{KACh} abolie les effets chronotropes négatifs de l'acétylcholine et du CCPA, ce qui est surprenant, nous pourrions nous attendre à ce que le courant I_f puisse encore générer un effet chronotrope négatif dans ce génotype. Cette observation suggère l'existence d'un lien inattendu entre les canaux $Ca_v1.3$ et HCN4. Des études futures vont essayer d'éclaircir ce point. Une possibilité à envisager est que l'entrée de Ca^{2+} au cours de la dépolarisation diastolique via les canaux $Ca_v1.3$ régules l'activité de l'adénylate cyclase et la synthèse de l'AMPc. La perte de fonction des canaux $Ca_v1.3$ pourrait baisser la concentration basale d'AMPc et influencer ainsi l'activation du courant I_f .

Une autre perspective importante consisterait en l'utilisation d'une lignée de souris qui porte des canaux $Ca_v1.3$ rendu insensibles à la régulation par la PKA. Ceci pourrait permettre d'étudier le rôle de $Ca_v1.3$ dans la régulation cholinergique de l'activité pacemaker sans provoquer une perte de fonction du canal qui réduit fortement la réserve de dépolarisation de la cellule pacemaker. Ceci est particulièrement vrai lorsque les canaux I_{KACh} s'activent dans les cellules ayant un génotype $Ca_v1.3^{-/-}$. Dans ce cas, lorsqu'on aboli I_{KACh} l'effet le plus évident est le sauvetage de l'activité pacemaker, soit en vivo ou bien *ex vivo*, car I_{KACh} présente un effet exacerbé à cause de la perte d'un mécanisme stimulateur de l'automatisme tel que $Ca_v1.3$. Des résultats récents montrent qu'il serait possible d'obtenir des canaux $Ca_v1.3$ insensibles à la PKA en supprimant l'expression de la protéine RAD, qui est associée au canal et qui est la cible de la PKA (Liu et al. 2020). L'équipe envisage la mise en place d'un projet pour cibler cette protéine dans le cœur de souris.

Annexes

Tables des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe frontale du cœur humain et représentation des oreillettes et des ventricules ..... - 16 -
Figure 2: Schéma d'une coupe frontale de cœur et tissu conducteur (en jaune) cardiaque - 17 -
Figure 3: Details des trois feuillets cardiaques et des espaces inter-feuillets..... - 18 -
Figure 4: La circulation sanguine dans le cœur..... - 20 -
Figure 5: Le système coronarien artérielle ..... - 21 -
Figure 6: Le système coronarien veineux..... - 21 -
Figure 7: Les jonctions inter-cardiomtocytes ..... - 24 -
Figure 8: La régulation de la contraction par le couple Troponine-Tropomyosine ..... - 25 -
Figure 9: Représentation du Calcium Induced Calcium Released dans un myocyte et visualisation sur la même echelle de temps d'un potentiel d'action, de la concentration de Ca2+ dans la cellule et de la contraction. D'après Bers, 2002. ..... - 26 -
Figure 10: A : Propagation du potentiel d'action sinusal dans le cœur et représentation des différents potentiels d'action dans le tissu conducteur. Adapté de Nerbonne et Kass, 2005. B : PA ventriculaire et les différentes phases qui le compose. ..... - 29 -
Figure 11: Les différentes morphologies des cellules pacemakers ; A : Chez le lapin. D'après Verheijck et al. 1998. B : chez la souris. D'après Mangoni et Nargeot, 2008. Une cellule atriale est présente pour la comparaison. ..... - 30 -
Figure 12: Modèle 3-Dimensionnel du NSA dans le tissu atrial. D'après Dobrzynski et al. 2005 ..... - 32 -
Figure 13: Modèle 3D de la zone pacemaker primaire (bleu foncé) et paranodale (bleu clair) en haute resolution. D'après Stephenson et al. 2017..... - 33 -
Figure 14: A : représentation du tissu nodal. B : enregistrement par microélectrode des potentiels d'action généré dans chacune des zones. CT : Crista Terminalis, SARB : branche droite de l'anneau sino atrial, IAS : septum interatrial, TRAB : trabecule de l'oreil ..... - 34 -
Figure 15: Illustration de la structure des jonctions communicantes ..... - 35 -
Figure 16: Illustration de la distribution des différentes connexines dans le NSA (en blanc) et son environnement direct. D'après Verheijck et al. 2001. ..... - 36 -
Figure 17: Les déplacement du site d'initiation de l'activité pacemaker en fonction de différents agents pharmacologiques ou ioniques. D'arès Boyett et al. 2000..... - 37 -
Figure 18: Illustration d'un canal HCN. En haut, représentation du tétramère ; en bas : Représentation d'un monomère avec ces 6 segments transmembranaires (dont le segment S4 en

rouge contenant le senseur de voltage) ainsi que son domaine CNBD. D'après Postea et Biel, 2011. ..... - 40 -
Figure 19: Schématisation de l'inhibition du canal HCN par l'ivabradine. D'après Dario DiFrancesco et Camm, 2004. ..... - 41 -
Figure 20: Représentation schématique des VDCC avec les sous-unités. D'après Striessnig et al, 2014 ..... - 43 -
Figure 21: Représentation schématique de la sous-unité a1 des VGCC. D'après Mangoni et al. 2006 ..... - 43 -
Figure 22: Gènes codants pour les 10 isoformes des VGCC. Adapté de Mangoni et.al 2006 ……- 44 -
Figure 23:Courbes courant-voltage et courbes d'inactivation des trois courants calciques de la cellule du NSA (en gris : valeurs de potentiel de membrane correspondants à la dépolarisation diastolique. D'après Mangoni et al. 2003 ..... - 46 -
Figure 24: Enregistrement de PA chez la souris WT et la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ en condition contrôle et en condition ISO. D'après Torrente et al. 2016) ..... - 46 -
Figure 25: Illustration de la différence de structure entre les TTCC et la structure des LTCC. D'après Chemin et.al, 2017 ..... - 48 -
Figure 26: Structure d'un VGSC. D'après Mao et al. 2019 ..... - 52 -
Figure 27: Moyenne de fluorescence (microscopie confocale) normalisée à la ligne de base de l'activité calcique de cellules de souris WT (activité uniforme) ou de souris NCX KO (activité de « burst » ou rafale suivie de pause). ..... - 55 -
Figure 28: Représentation de « Line-Scan » pris en microscopie confocale qui représente l'activité globale du Ca^{2+} durant les phases de dépolarisation diastolique avec les LCR (flèches blanches) pour les cellules de souris WT, qui sont fortement réduites dans les cellules pacemaker des souris $Ca_v1.3^{-/-}$. ..... - 58 -
Figure 29: Simulation numérique de l'activité spontanée de la cellule pacemaker de souris avec les courants ioniques contribuant à l'automatisme avec le voltage transmembranaire simulé grâce à un modèle d'automatisme cardiaque chez la souris suivi des ioniques impliqués lors de cet automatisme cardiaque : courant If porté par les canaux HCN, courant I_{CaL} porté par les canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$ et le courant Ist qui partagent les mêmes bases moléculaires que $Ca_v1.3$, courant I_{CaT} porté par $Ca_v3.1$, le courant INa porté par les canaux sodiques sensibles à la TTX et le courant I_{Kr} porté par ERG1. D'après Christel et al. 2012- 61 -
Figure 30: Illustration des voies de signalisation du système nerveux autonome sympathique et parasympathique dans la cellule pacemaker. Daprès Mangoni et Nargeot, 2008. ..... - 63 -

Figure 31: Les voies d'action des neurotransmetteurs du SNA ..... - 63 -
Figure 32: Schématisation de l'ouverture d'un canal HCN en présence d'AMPc. D'après Wainger et al. 2001 ..... - 64 -
Figure 33: Illustration de la régulation par le SNA sympathique d'un canal calcique de type L ; A : en condition basal ; B : en condition de stimulation du récepteur adrénergique. D'après Hell, 2010. ..... - 65 -
Figure 34: A : Fréquence cardiaque de souris WT et GIRK4$^{-/-}$ en condition contrôle et en présence d'ACh ; B : Visualisation de la récupération après un test à l'effort de la fréquence cardiaque sur souris WT et GIRK4$^{-/-}$; C : Visualisation de la récupération après stimulation pharmacologique du SN sympathique de la fréquence cardiaque sur souris WT et GIRK4$^{-/-}$. D'après Mesirca et al. 2013..... - 69 -
Figure 35: a : Réduction de la fréquence des potentiels d'action en présence d'ACh ; b : Réduction du courant If en présence d'ACh D'après DiFrancesco, 1993, 2010. ..... - 70 -
Figure 36: Diminution de la densité du courant calcique de type L dans les cellules du NSA de lapin. D'après Petit-Jacques et al. 1993 ..... - 71 -
Figure 37: Réponse du courant I_{CaL} en présence des neurotransmetteurs des système nerveux sympathique et parasympathique. D'après Han et al. 1994 ..... - 71 -
Figure 38: Inhibition du courant I_{CaL} en présence d'ACh. D'après Zaza et al. 1996..... - 72 -
Figure 39: Le courant I_f porté par le canal HCN4 en condition contrôle (noir) et en présence d'isoprénaline (en rouge) chez les souris WT et les souris HCN4-CNBD. A : Exemple de tracé du courant I_f. B : Courbe de densité du courant en fonction du voltage. D'après Alig et al. 2009 ..... - 75 -
Figure 40: Le courant I_{CaL} dans les cellules du NSA sur lesquelles on applique un protocole d'étape de plusieurs voltages dépolarisant. A : sur cellules de souris WT. B : et souris $Ca_v1.3^{-/-}$. C : Courbe I-V du courant I_{CaL} dans des cellules du NSA de souris WT (cercles pleins) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (cercles vides). D'après Mangoni et al. 2003. ..... - 76 -
Figure 41: A : Exemple de tracé du courant I_{KACh} en présence d'ACh dans des cellules de souris WT et GIRK4$^{-/-}$. B : Densité du courant I_{KACh} à différentes concentration d'ACh dans des cellules pacemaker de souris WT (cercles pleins) et GIRK4$^{-/-}$ (cercles vides). D'après Mesirca et al. 2013. ..... - 77 -
Figure 42: Composition du système de perfusion d'un cœur isolé perfusé comprenant un système de chauffe, un système de régulation de la pression (senseur de pression et pompe péristaltique connectés) ainsi que des électrodes. ..... - 80 -
Figure 43: Exemple de tracé d'EGC *ex vivo* ..... - 82 -

Figure 44: Préparation du tissu sinusal. A droite:photo de la préparation et marquage des zones d'interêts. A gauche:carte d'activation et conduction de la depolarisation sur le tissu ……- 84 -
Figure 45: Exemple de tracé analysé de cartographie optique ..... - 85 -
Figure 46: Exemple de tracé de transitoire calcique et son intégrale ..... - 88 -
Figure 47: Illustration des sutures souris..... - 93 -
Figure 48: Illustration des dérivations utilisé en échocardiographie dont la dérivation II d'après le triangle d'Einthoven. ..... - 94 -
Figure 49: Etude de la fréquence cardiaque in vivo par télémétrie. A (haut): Moyenne de suivi dans le temps de la fréquence cardiaque avant et après stimulation β-adrénergique par injection IP d'ISO à 0.1 mg/kg de N=20 souris WT (tracé noir), N=8 souris HCN4-CNBD/$Ca_v1.3^{-/-}$ (tracé rouge), N=17 souris $Ca_v1.3^{-/-}$ (tracé vert) et N=17 souris HCN4-CNBD (tracé gris). A (milieu) : tracé ECG avant injection d'ISO et A (bas) : tracé ECG après injection d'ISO des quatre génotypes. B : Histogramme des moyennes des fréquences cardiaques avant et après injection d'ISO des quatre génotypes. Test statistique : t-test appareillé..... - 98 -
Figure 50: Moyenne des fréquences cardiaques avec injection IP de Carbachol (A) de souris WT (n=5 pour 0.1 mg/kg et n=6 pour 0.2 mg/kg), $Ca_v1.3^{-/-}$ (n=6 pour 0.1 mg/kg et n=7 pour 0.2 mg/kg), $GIRK4^{-/-}$ (n=5 pour 0.1 mg/kg et n=6 pour 0.2 mg/kg) et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (n=7 pour 0.1 mg/kg et n=7 pour 0.2 mg/kg). Différence de réduction de la fréquence cardiaque entre les génotypes pour Carbachol 0.1 mg/kg (B) et 0.2 mg/kg (C). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.. - 100 -
Figure 51: Moyenne des fréquences cardiaques avant et après l'IP de CCPA (10 mg/kg) pour 5 souris WT, 7 souris $Ca_v1.3^{-/-}$, 6 souris $GIRK4^{-/-}$ et 5 souris $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. Test statistique : T test appareillé. ..... - 101 -
Figure 52: Moyenne des fréquences cardiaques avant et après l'IP d'HEXA (10 mg/kg) pour 5 souris WT, 6 souris $Ca_v1.3^{-/-}$, 6 souris $GIRK4^{-/-}$ et 7 souris $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. Test statistique : T test appareillé. ..... - 102 -
Figure 53: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris WT avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement. ..- 103 -

Figure 54: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement. ..... - 104 -

Figure 55: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris $GIRK4^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement. ..... - 105 -

Figure 56: Moyenne du suivi de la fréquence cardiaque des souris $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ avant et après l'injection (t=0) après l'injection d'HEXA (10 mg/kg), HEXA et Carbachol (0.2 mg/kg) (A), HEXA et Atropine (0.5 mg/kg) et Propranolol (5 mg/kg) (B) et HEXA et CCPA (0.1 mg/kg). D : Différence de réduction de la fréquence cardiaque avec HEXA+CCPA et CCPA seulement..... - 106 -

Figure 57: Etude ex vivo de l'ECG sur cœur isolé perfusé. Moyenne de la fréquence atriale en condition d'ISO à 0.1 µM (exemple de trace en bas à gauche), en ISO et ACh 1 µM puis ISO et ACh 3 µM (exemple de trace en bas à droite) pour N=15 cœurs WT (A), N=12 cœurs HCN4-CNBD (B), N=11 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), N=13 cœurs $GIRK4^{-/-}$ (D), N=13 cœurs HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et N=12 cœurs $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ (F). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey..... - 109 -

Figure 58: Etude de la fréquence de dépolarisation des tissu sinusaux par cartographie optique. Moyenne de la fréquence de dépolarisation en condition contrôle, après perfusion d'ACh à 1 µM, puis à 10 µM (en haut), avec tracé exemple en condition contrôle (milieu), et ACh 10 µM (bas) pour N=9 tissus WT (A), N=12 tissus HCN4-CNBD (B), N=11 tissus $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), N=11 tissus $GIRK4^{-/-}$ (D), N=8 tissus HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et N=7 tissus $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ (F). Pourcentage de réduction de la fréquence de dépolarisation pour chaque génotype à ACh 1 µM (G) et 10 µM (H). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. ..... - 112 -

Figure 59: Moyenne de déplacement du site d'origine de la dépolarisation sur le tissu sinusal en fonction de la condition contrôle après perfusion d'ACh 1 µM et ACh 10 µM pour N=9 tissus WT (A'), N=12 tissus HCN4-CNBD (B'), N=11 tissus Cav1.3-/- (C'), N=11 tissus $GIRK4^{-/-}$ (D'), N=8 tissus HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E'), et N=8 tissus $Ca_v1.3^{-/-}/GIRK4^{-/-}$ (F').

*P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. ..... - 114 -
Figure 60: Enregistrement de l'activité spontanée des potentiels d'action en current-clamp. Moyenne de la fréquence des potentiels d'actions des cellules isolées du NSA avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM pour n=13 cellules WT (A), n=12 cellules HCN4-CNBD (B), n=8 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (C), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (D), n=12 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (E), et n=10 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (F) en haut. En bas, tracé exemple en rouge de la condition d'ISO à 0.1 µM, en bleu la condition d'ISO et ACh 0.05 µM et en vert la condition d'ISO et d'ACh 1 µM. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. ..... - 117 -
Figure 61: Etude de la dynamique calcique dans les cellules pacemaker. En condition d'ISO à 0.1 µM et en ISO et ACh à 0.05 µM, A : Moyenne de la fréquence des transitoires calciques, pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey ..... - 119 -
Figure 62: Moyenne du nombre de libération locales de calcium (LCR), pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3$-$^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). F : Résumé des moyennes des LCR dans la condition ISO et ACh *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey. ..... - 121 -
Figure 63: Amplitude moyenne des transitoires calciques dans la condition ISO et ACh pour n=8 cellules WT (A), n=13 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$ (B), n=9 cellules $GIRK4^{-/-}$ (C), n=11 cellules HCN4-CNBD/$GIRK4^{-/-}$ (D), et n=11 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$ (E). F : Résumé des moyennes de l'amplitude des transitoires calciques dans la condition ISO et ACh. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey ...- 123 -
Figure 64:Courant diastolique des cellules isolées du NSA des souris WT, $Ca_v1.3^{-/-}$, $GIRK4^{-/-}$ et $Ca_v1.3^{-/-}$/$GIRK4^{-/-}$. Tracés exemples (B, C, D, E, figure du haut) et moyennes des intégrales de temps (B, C, D, E, figure du bas) mesurées entre le voltage correspondant au potentiel diastolique maximum (-61 mV) et le seuil du potentiel d'action suivant (-42 mV) d'un échantillon de potentiel d'action SAN de souris utilisé comme commande de voltage-clamp. A : Protocole de voltage clamp. Le courant est mesuré en condition contrôle, après perfusion d'ISO à 0.1 µM puis d'ISO en présence de 0.05 µM d'ACh pour B : n=6 (WT), C : n=6 ($Ca_v1.3^{-/-}$),

D : n=12 (GIRK4$^{-/-}$) et E : n=10 (Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$). F : Résumé des moyennes des intégrales de temps du courant diastolique dans la condition ISO et ACh *P < 0.05; ***P < 0.001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Tukey… ..... - 126 -
Figure 65: Enregistrement du courant calcique de type L (I_{CaL}) avec un protocole dépolarisant de voltage-clamp à partir d'un potentiel de maintien de -55 qui permet l'activation de ce courant. Tracé exemple de ICaL sur des cellules pacemaker WT (A) et Cav1.3-/- (B). C : Protocole de dépolarisation utilisé en voltage-clamp. Moyenne des densités du courant I_{CaL} dans les cellules isolées du NSA en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM pour n=4 cellules WT (D), n=6 cellules Ca$_v$1.3$^{-/-}$ (E). *P < 0.05; ***P < 0.001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 66: Moyenne de la relation courant-voltage de I_{CaL} de cellules pacemakers de souris WT (n=7) et Cav1.3-/- (n=3) en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne. ..... - 129 -
Figure 67: Enregistrement effectué sur des cellules isolées du NSA en condition de stimulation β-adrénergique avec de l'ISO à 0.1 µM (trace exemple en rouge) puis après une perfusion d'ISO et d'ACh 0.05 µM (trace exemple en bleu) ou avec de l'ISO et d'ACh 1 µM (trace exemple en vert) des cellules pacemaker de souris WT et Ca$_v$1.3$^{-/-}$. Encadré gris : gamme de voltage de la dépolarisation diastolique. ..... - 130 -
Figure 68: Moyenne des fréquences cardiaques en baseline pour 6 souris WT, 8 souris Ca$_v$1.3$^{-/-}$, 6 souris GIRK4$^{-/-}$ et 7 souris Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : One-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett. ..... - 131 -
Figure 69: Moyenne de l'effet de l'ISO sur la fréquence atriale ex vivo sur N=15 cœurs WT, N=11 cœurs HCN4-CNBD, N=11 cœurs Ca$_v$1.3$^{-/-}$, N=13 cœurs GIRK4$^{-/-}$, N=13 cœurs HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$), et N=12 cœurs Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK$^{4-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : T-test non appareillé ..... - 133 -
Figure 70: Etude de l'automatisme cardiaque par la fréquence des potentiels d'action entre la condition contrôle et l'ISO pour (en condition contrôle) n=9 cellules WT, n=10 cellules HCN4-CNBD, n=7 cellules Ca$_v$1.3$^{-/-}$, n=7 cellules GIRK4$^{-/-}$, n=5 cellules HCN4-CNBD/GIRK4$^{-/-}$, et n=10 cellules Ca$_v$1.3$^{-/-}$/GIRK4$^{-/-}$. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Test statistique : T-test non appareillé ..... - 135 -

Figure 71: Moyenne des densités du courant I_{CaL} dans les cellules isolées du NSA en condition contrôle et avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM pour n=4 cellules WT, n=6 cellules $Ca_v1.3^{-/-}$. *P < 0.05. Test statistique : T-test appareillé ..... - 136 -
Figure 72: Moyenne de la relation courant-voltage de I_{CaL} de cellules pacemakers de souris WT (n=7) et $Ca_v1.3^{-/-}$ (n=3) en condition contrôle, avec une perfusion d'ISO à 0.1 µM, en perfusion d'ISO et d'ACh à 0.05 µM puis en perfusion d'ISO et d'ACh à 1 µM. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne ..... - 137 -

Publication associée à mon nom

M. Baudot et collaborateurs, Scientific Reports, 2020.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

Concomitant genetic ablation of L-type $Ca_v1.3$ (α_{1D}) and T-type $Ca_v3.1$ (α_{1G}) Ca^{2+} channels disrupts heart automaticity

Matthias Baudot[1,2], Eleonora Torre[1,2,3], Isabelle Bidaud[1,2], Julien Louradour[1,2], Angelo G. Torrente[1,2], Lucile Fossier[1,2], Leïla Talssi[1,2], Joël Nargeot[1,2], Stéphanie Barrère-Lemaire[1,2], Pietro Mesirca[1,2] & Matteo E. Mangoni[1,2]

Cardiac automaticity is set by pacemaker activity of the sinus node (SAN). In addition to the ubiquitously expressed cardiac voltage-gated L-type $Ca_v1.2$ Ca^{2+} channel isoform, pacemaker cells within the SAN and the atrioventricular node co-express voltage-gated L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ Ca^{2+} channels (SAN-VGCCs). The role of SAN-VGCCs in automaticity is incompletely understood. We used knockout mice carrying individual genetic ablation of $Ca_v1.3$ (*$Ca_v1.3^{-/-}$*) or $Ca_v3.1$ (*$Ca_v3.1^{-/-}$*) channels and double mutant *$Ca_v1.3^{-/-}$/$Ca_v3.1^{-/-}$* mice expressing only $Ca_v1.2$ channels. We show that concomitant loss of SAN-VGCCs prevents physiological SAN automaticity, blocks impulse conduction and compromises ventricular rhythmicity. Coexpression of SAN-VGCCs is necessary for impulse formation in the central SAN. In mice lacking SAN-VGCCs, residual pacemaker activity is predominantly generated in peripheral nodal and extranodal sites by f-channels and TTX-sensitive Na^+ channels. In beating SAN cells, ablation of SAN-VGCCs disrupted late diastolic local intracellular Ca^{2+} release, which demonstrates an important role for these channels in supporting the sarcoplasmic reticulum based "*Ca^{2+} clock*" mechanism during normal pacemaking. These data implicate an underappreciated role for co-expression of SAN-VGCCs in heart automaticity and define an integral role for these channels in mechanisms that control the heartbeat.

Heart automaticity is reliant on the primary pacemaker activity of the sino-atrial node (SAN) and impulse conduction through the principal components of the conduction system: the atrioventricular node (AVN), the His bundle and the Purkinje fibres network[1]. Under physiological conditions, the SAN generates cardiac automaticity whereas the AVN and the Purkinje fibres network initiate automaticity in case of SAN failure. Automaticity in cardiac cells is due to diastolic depolarization, a slow phase of the action potential cycle driving the membrane voltage from the end of the repolarization to the threshold of the following action potential[2]. While several aspects of SAN pacemaker mechanisms are still incompletely understood, there is general agreement that diastolic depolarization is generated by an interplay between the activity of ion channels of the plasma membrane and local diastolic intracellular Ca^{2+} release (LCR) from ryanodine receptors (RyRs) of the sarcoplasmic reticulum (SR)[3–5].

Among plasmalemmal ion channels, hyperpolarization-activated "funny" f-channels of the HCN family[6], voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs)[7], voltage-dependent tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ channels mediating the neuronal Na^+ current ($I_{Na(TTX)}$)[8–11] and transient receptor potential (TRPM and TRPC)[12–14] channels have been shown to contribute to automaticity in the SAN or in the AVN. The contribution of RyR-dependent Ca^{2+} release to automaticity is currently interpreted in the framework of the "*coupled clock*" model of pacemaking[3,15,16]. Two functional components form the *coupled clock*: the spontaneous SR-based "*Ca^{2+} clock*" mechanism and the "*membrane clock*" (or voltage clock)[15]. A cyclical phenomenon of spontaneous voltage-independent LCR events generates the *Ca^{2+} clock*. Indeed, spontaneous LCRs can be observed in the absence of changes in membrane voltage and constitute the hallmark of the *Ca^{2+} clock*[17]. During pacemaking, spontaneous LCRs are generated by early diastolic openings of RyRs that activate the cardiac Na^+–Ca^{2+} exchanger (NCX1)[17,18]. This electrogenic

[1]Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, Inserm, 141, rue de la cardonille, 34094 Montpellier, France. [2]LabEx ICST, Montpellier, France. [3]Department of Biotechnology and Biosciences, Università Degli Studi di Milano-Bicocca, Milan, Italy. email: Pietro.Mesirca@igf.cnrs.fr; matteo.mangoni@igf.cnrs.fr

transport generates an inward current that contributes to diastolic depolarization[19]. Sequential and cyclical activation of plasmalemmal ion channels during pacemaking forms the *membrane clock*[15,16]. In the *coupled-clock* model of pacemaking, f-channels are important activators of the *membrane clock* at the beginning of diastolic depolarization[15]. In the last fraction of diastolic depolarization, T- and L-type Ca^{2+} channels activate in cooperation with NCX to drive the membrane voltage to the action potential threshold[16]. During the action potential phase, Ca^{2+} entry via L-type VGCCs refills the SR Ca^{2+} load, allowing new diastolic LCRs to occur in the following cycle. Therefore, under normal conditions, the *Ca^{2+} clock* and the *membrane clock* mutually entrain and synchronize to generate robust physiological pacemaking[15,16] (see Refs.[3–5] for review).

The adult mammalian heart expresses three VGCCs isoforms[7]: L-type $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels, as well as T-type $Ca_v3.1$ channels. These isoforms show differential expression in the working myocardium and in automatic tissue. In particular, adult ventricular myocytes express L-type $Ca_v1.2$ channels[20], which couple excitation to contraction in the myocardium[21]. $Ca_v1.2$ channels are also ubiquitously expressed in the SAN region and in the conduction system[20]. In contrast, L-type $Ca_v1.3$ channels are highly expressed in automatic tissue[20] and, in lower densities, in atria[20,22]. Finally, T-type $Ca_v3.1$ channels are not functionally expressed in the adult working myocardium but show strong expression in the SAN and in the AVN[23]. $Ca_v1.3$ functionally differs from the other cardiac L-type isoform. Under basal conditions, the threshold for activation of $Ca_v1.3$-mediated L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) in SAN cells is significantly more negative (−50 mV) than that of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} (−30 mV)[24], which controls the excitation–contraction coupling mechanism in the working myocardium. β-adrenergic activation shifts the threshold of both $Ca_v1.3$- and $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} by ~5 mV to more negative voltages[24]. T-type $Ca_v3.1$ channels activate at more negative voltages than $Ca_v1.3$. In SAN cells, the threshold for activation of $Ca_v3.1$-mediated T-type Ca^{2+} current (I_{CaT}) is more negative than that of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} (−55 mV) and its half-inactivation voltage is more negative (−70 mV)[23,24]. Previous studies showed that L-type $Ca_v1.3$ channels contribute to the generation of diastolic depolarization in the SAN[24] and AVN[25,26]. In addition, we have showed that $Ca_v1.3$ channels contribute to the generation of diastolic LCRs and are necessary to synchronize LCRs events under β-adrenergic activation of pacemaking[27]. T-type $Ca_v3.1$ channels have also been shown to contribute to automaticity in the SAN[24,28] and in the AVN[25]. Importantly, loss-of-function of $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ channels underlies congenital[29] and autoimmune[30] forms of SAN dysfunction associated with disturbances of atrioventricular conduction.

Despite this physiological relevance, it is currently unknown whether normal automaticity, heart rate and rhythm are contingent on the co-expression of L-type $Ca_v1.3$ and T-type $Ca_v3.1$ channels (hereby named SAN-VGCCs). In addition, genetic and functional evidence of the impact of co-expression of SAN-VGCCs within the *coupled clock* model are currently lacking. Here we hypothesised that co-expression of SAN-VGCCs is necessary to generate normal cardiac automaticity and to ensure synchrony between atrial and ventricular rhythmicity. We also hypothesised that, because of their negative voltage threshold for activation, SAN-VGCCs may constitute an important factor for generating the *coupled clock* pacemaker mechanism. To address this, we created a mouse model in which the two SAN-VGCCs expressed in the SAN and the AVN but not in the ventricle have been ablated ($Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$). We demonstrate that co-expression of SAN-VGCCs is necessary to maintain pacemaking in the SAN and for proper impulse propagation, as well as to maintain normal impulse conduction and ventricular rhythmicity. We also show that SAN-VGCCs are necessary to generate late diastolic LCRs involved in the *coupled clock* pacemaker mechanism, a function that $Ca_v1.2$ channels cannot maintain in the absence of SAN-VGCCs.

Results

Concomitant ablation of SAN-VGCCs abolishes VGCCs-mediated Ca^{2+} current in the voltage range of diastolic depolarization. We studied the consequences of concomitant ablation of SAN-VGCCs on total VGCCs-mediated current (I_{Ca}) in isolated SAN pacemaker cells from control and mutant ($Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) mice. I_{Ca} was first recorded from a holding potential (HP) of −80 mV to record I_{CaL} and I_{CaT}[23,24]. Samples traces of total Ca^{2+} current (I_{Ca}) are reported in Fig. 1A for wild-type, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. To separate I_{CaL} from I_{CaT}, we switched the HP to −55 mV to inactivate I_{CaT} (Fig. 1A). This HP inactivates about 15–20% of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}, but completely inactivates $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT}[7]. In wild-type SAN cells, net I_{CaT} was calculated as the difference between traces obtained at HP of −55 mV from those at HP −80 mV (Fig. 1B-a, dashed line). We recorded only I_{CaL} flowing through $Ca_v1.3$ and $Ca_v1.2$ isoforms in $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, whereas I_{CaT} was undetectable (Fig. 1B-b). In $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN cells, total I_{Ca} (black dots, Fig. 1B-c) was generated by $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} and $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} (red dots, Fig. 1B-c). We quantified I_{CaT} by subtracting traces obtained at the two different HPs (Fig. 1B-c, dashed line). In $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells the residual I_{Ca} recorded was $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL}, which was recognizable by its activation at positive membrane voltages, and faster inactivation kinetics than $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} recorded in wild-type cells (Fig. 1B-d). No I_{Ca} could be recorded at voltages negative to −35 mV in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. A comparison between I_{Ca} densities recorded in SAN cells from wild-type and mutant animals is depicted in Fig. 1C (HP = −80 mV) and Fig. 1D (HP = −55 mV). In conclusion, concomitant ablation of SAN-VGCCs abolished diastolic I_{Ca} in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells.

Deep bradycardia and heart block in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. To evaluate SAN pacemaking and atrioventricular (AV) conduction, we recorded in vivo atrial rates (P–P interval) and ventricular rates (HRs) in mutant mice, under control conditions (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1, ANS+) and following combined injection of atropine and propranolol (Fig. 2B, ANS–) to inhibit autonomic input. All mutant mice displayed significant slowing of atrial and ventricular rates: $Ca_v3.1^{-/-}$ (~10%), $Ca_v1.3^{-/-}$ (~30%) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (~35%) in comparison to wild-type counterparts under control conditions (Fig. 2A,C,E and Supplementary

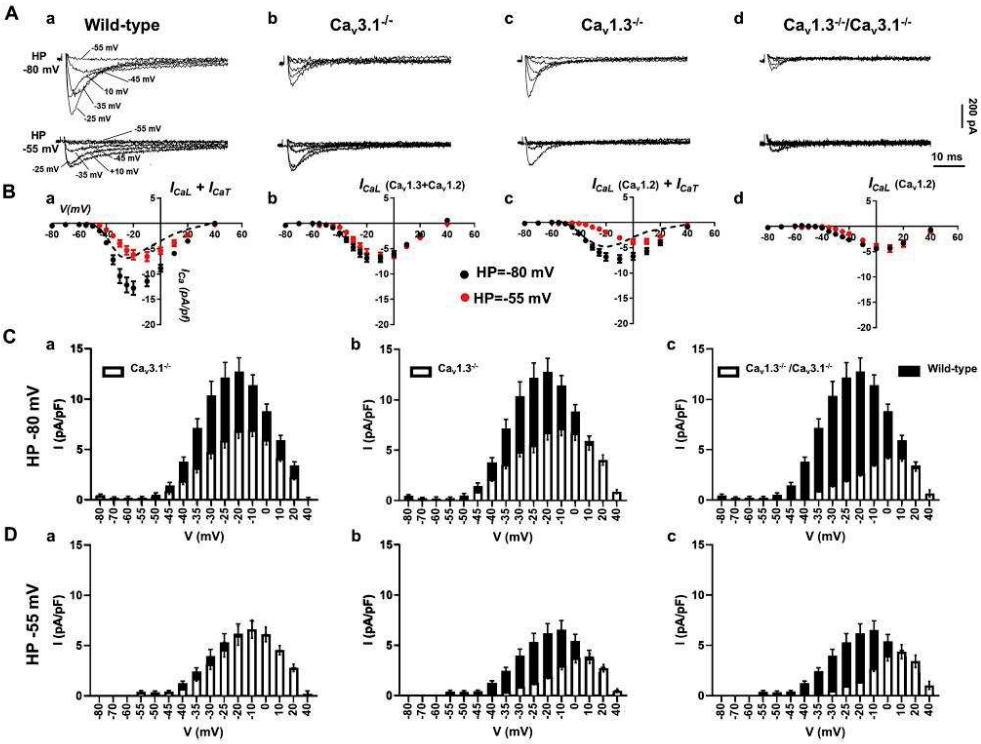
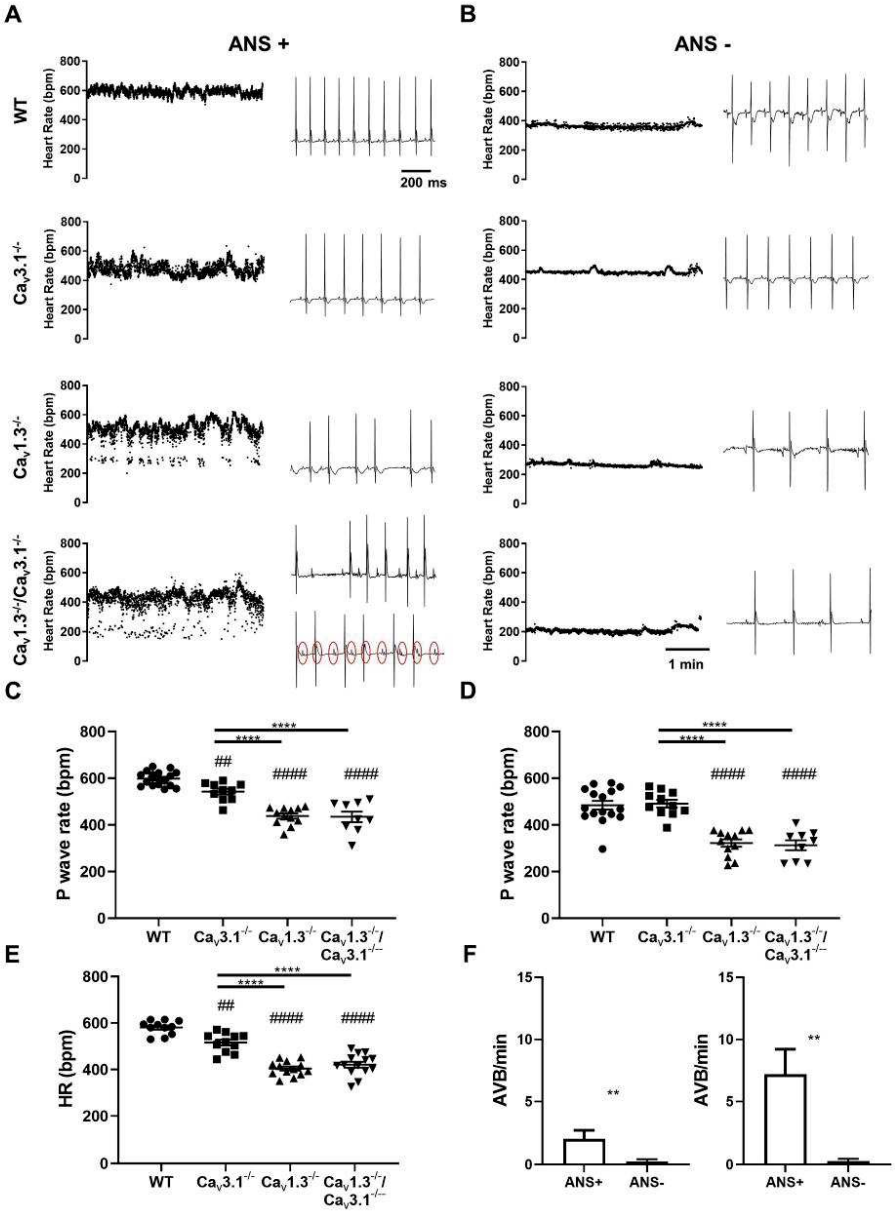


Figure 1. I_{Ca} in isolated SAN cells from wild-type and mutant mice. (**A**) Sample traces recorded from a HP of −80 mV (top line) or from −55 mV (bottom line) in SAN cells of wild-type *(WT)* (a), *$Ca_v3.1^{-/-}$* (b), *$Ca_v1.3^{-/-}$* (c) and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice (d). (**B**) Current-to-voltage (I–V) relationship of Ca^{2+} current recorded from a HP = −80 mV (black circles) or from HP = −55 mV (red circles) in SAN cells from the following genotypes: wild-type (a, n = 16), *$Ca_v3.1^{-/-}$* (b, n = 15), *$Ca_v1.3^{-/-}$* (c, n = 15) and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice (d, n = 18). In (a) and (b), the dashed line indicates the net I_{CaT} I–V curve, calculated as the difference between values obtained from HP of −55 mV from those from HP −80 mV. (**C**,**D**) Relative density of I_{CaT} and I_{CaL} recorded in SAN cells isolated from wild-type (black bars, n = 16), *$Ca_v3.1^{-/-}$* (a, open bars, n = 15), *$Ca_v1.3^{-/-}$* (b, open bars, n = 15) and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice (c, open bars, n = 18) at different test potentials from HP = −80 mV (**C**) and HP = −55 mV (**D**).

Fig. 1). We recorded deep bradycardia in *$Ca_v1.3^{-/-}$* and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice under inhibition of autonomic nervous system (~310 bpm, Fig. 2B–D). The averaged atrial rates of *$Ca_v1.3^{-/-}$* and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice did not differ significantly, either under control conditions or following inhibition of autonomic nervous system input, suggesting that $Ca_v3.1$ channels may share a common downstream effector with $Ca_v1.3$ to generate pacemaking. Both *$Ca_v1.3^{-/-}$* and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice showed high incidence of 2nd degree AV block (Fig. 2A). None of the *$Ca_v1.3^{-/-}$* mice studied presented with complete 3rd degree AV block (complete heart block). In contrast, 25% of *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice presented complete 3rd degree AV block (Fig. 2A), indicating additive effects of SAN-VGCCs ablation on AV conduction. Inhibition of the autonomic nervous system input reduced atrial rates in all genotypes tested and abolished 2nd and 3rd degree AV blocks in mutant mice (Fig. 2F). The AV conduction time (PR interval) was increasingly prolonged in mutant *$Ca_v3.1^{-/-}$*, *$Ca_v1.3^{-/-}$* and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice (Supplementary Fig. 1). The uncorrected QT interval was also significantly prolonged in *$Ca_v1.3^{-/-}$* and *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice (Supplementary Fig. 1). Taken together, these results indicate additive effects of $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ loss-of-function on AV conduction.

Rhythm dissociation and ventricular arrhythmia in *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* hearts. Because we observed complete 3rd degree AV block in *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* mice, we addressed the consequences of concomitant ablation of SAN-VGCCs on intrinsic heart automaticity, in the absence of autonomic input, in Langendorff-perfused hearts (Fig. 3). The spontaneous atrial rates of mutant hearts were lower than that of wild-type counterparts. Contrary to what we observed in vivo, all *$Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$* hearts investigated displayed complete 3rd degree AV block and rhythm dissociation (Fig. 3A,B). Rhythm dissociation was evidenced by the difference


A
ANS +
B
ANS -
WT
Heart Rate (bpm)
200 ms
1 min
C
D
P wave rate (bpm)
WT
E
F
HR (bpm)
AVB/min
ANS+
ANS-

◂**Figure 2.** ECG recordings in wild-type and mutant mice. (**A**) Sample dot plots of heart rate (left panels) and ECG recordings (right panels) under control conditions with autonomic nervous system (ANS+) in wild-type (*WT*, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. Red circles indicate P waves in ECG recording in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice presenting 3rd degree AV block. (**B**) Dot plots of heart rate (left panels) and ECG recordings (right panels) following intraperitoneal injection of atropine (1 mg/kg) and propranolol (5 mg/kg) to inhibit the input of the autonomic nervous system (ANS−) in *WT*, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$mice. (**C**,**D**). Averaged rate of P waves (atrial rate) in wild-type (n = 16) and mutant mice under control conditions (ANS+) (**C**, $Ca_v3.1^{-/-}$ n = 10, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 12, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 9) or following concomitant injection of atropine and propranolol (ANS−) (**D**, *WT* n = 16 $Ca_v3.1^{-/-}$ n = 11, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 12, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 9) conditions. (**E**) Averaged ventricular rates (HR) in wild-type (n = 11) and mutant mice ($Ca_v3.1^{-/-}$ n = 11, $Ca_v1.3^{-/-}$ n = 13, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ n = 14) under control (ANS+) conditions. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons. Whiskers indicate mean ± the SEM. (#) Indicates comparison with wild-type. (**F**) Number of atrioventricular blocks (AVB) under control and atropine and propranolol inhibition conditions in n = 12 $Ca_v1.3^{-/-}$ (left) and n = 9 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (right) mice. Statistics: unpaired *t* test. (#) Indicates comparison with wild-type. Statistics: Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

between measured atrial and ventricular rates in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts (Fig. 3C). Furthermore, concomitant ablation of the two SAN-VGCCs was highly proarrhythmic. Indeed, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts showed atrial and ventricular escape rhythms, suggesting extranodal impulse generation, as well as episodes of ventricular tachycardia (Supplementary Fig. 2). Taken together, these observations indicated that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted normal automaticity of intact hearts by impairing impulse generation in the SAN, as well as by inducing complete block of AV conduction and ventricular arrhythmia.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts SAN automaticity and shifts the pacemaker leading sites to peripheral SAN or to extranodal locations. Since we recorded limited residual SAN driven heart automaticity in isolated $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts we attempted to study SAN impulse formation and localization using optical mapping (OM) of membrane voltage in isolated SAN/atria preparations. All wild-type SAN/atria preparations consistently displayed the pacemaker leading site within a limited region of the central cranial side of the SAN at the entry of superior *vena cava* in the right atrium and close to the border of the *Crista Terminalis* (Fig. 4A). In contrast, we found that automaticity in $Ca_v3.1^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations was characterized by the presence of at least two leading sites with alternating dominance in 5 out of 8 and in 4 out of 7 tissues tested, respectively (Fig. 4A). In addition, 2 out of 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations showed 3 alternating leading sites. Finally, all $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ preparations studied displayed alternating automaticity between two or three leading sites (Fig. 4A). In $Ca_v3.1^{-/-}$ preparations, secondary leading sites appeared in the correspondence of the nodal extension caudally to the inferior *vena cava*[31]. In $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria we observed secondary leading sites also in the right or left atrium (Fig. 4A). Emergence of multiple extranodal leading sites was accompanied by increasingly slow automaticity in $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations (Fig. 4B). Consistent with slowing of automaticity, the coefficient of variability of atrial rate also increased with concomitant ablation of SAN-VGCCs in comparison to wild-type counterparts (Fig. 4C). The rate of atrial impulse was negatively correlated with the distance between the alternating leading sites, suggesting increasing dominance of peripheral SAN or extranodal sites in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations (Fig. 4D). Taken together, these observations indicate that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted primary SAN automaticity and shifted pacemaker activity to peripheral SAN or to extranodal sites resulting in slow atrial rates.

I_f and I_{NaTTX} sustain automaticity in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo. Since we observed residual automaticity in hearts of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$, originating either in the peripheral SAN or in extranodal regions (Fig. 4), we attempted to identify the mechanisms underlying residual pacemaking. f-(HCN) channels underlie cardiac I_f[32,33]. Because of their direct sensitivity to intracellular cAMP, f-channels are targets of opposite regulation of HR by catecholamines and acetylcholine[2]. We thus hypothesized that the decrease in HR observed in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice following inhibition of the autonomic nervous system was generated by concomitant atropine induced I_{KACh} inhibition[34,35] and propranolol induced shift of I_f activation to more negative voltages (Fig. 2B). We thus administered selective I_f blocker ivabradine (6 mg/kg) to wild-type and mutant mice and recorded HR under these conditions (Fig. 5). Ivabradine decreased the HR in all genotypes and reduced atrioventricular blocks in in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (Fig. 5A–D). The HR recorded in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under ivabradine administration was similar to that observed in the same mice under atropine and propranolol, suggesting that I_f was contributing to set the HR in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo under the action of the autonomic nervous system. We did not observe episodes of spontaneous atrial or ventricular arrhythmia in wild-type or mutant mice upon administration of ivabradine. The difference in HR before and after ivabradine administration was similar among wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ mice, but was increased in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$mice (Fig. 5D), showing that individual deletion of $Ca_v1.3$ or concomitant ablation of SAN-VGCCs increased the relative importance of I_f to residual HR.

We then investigated the origin of the residual SAN automaticity following inhibition of I_f under ex vivo conditions, to prevent potentially lethal bradycardia in vivo. Similarly to in vivo conditions, ivabradine (10 μM) induced low HRs in isolated hearts from mutant $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice (< 100 bpm; Fig. 6A). Previous work showed that $I_{Na(TTX)}$ contributes to the basal HR and to SAN pacemaker activity in mammals[8–11]. We thus employed a moderate concentration of TTX (100 nM) to investigate the contribution of this current to the

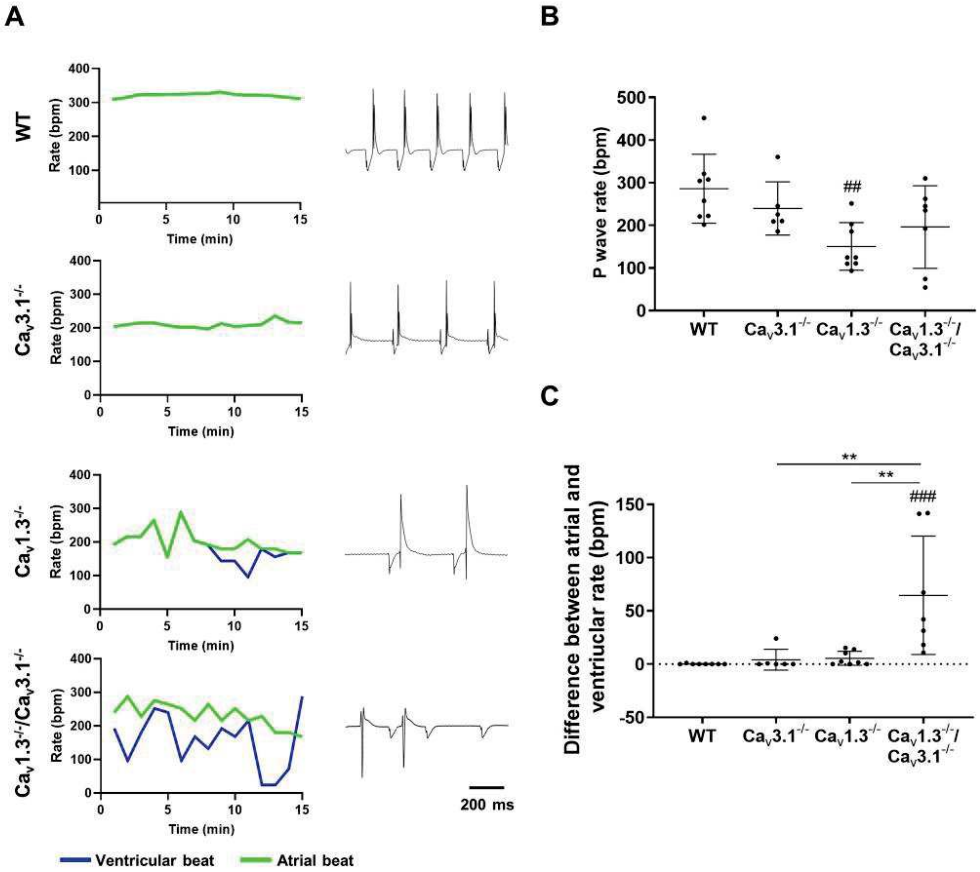


Figure 3. Rhythm dissociation in mutant hearts following concomitant deletion of SAN-VGCCs. (**A**) Line plots of atrial (green line) and ventricular (blue line) rates (left panel) and sample ECGs (right panel) recorded ex vivo on isolated Langendorff perfused heart under control conditions in n = 8 *WT*, n = 6 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 8 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$. (**B**) P wave rates in isolated wild-type and mutant hearts under control conditions. (**C**) Differences between atrial and ventricular rates of isolated hearts. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons. Whiskers indicate mean ± the SEM. (#) Indicates comparison with wild-type.

residual automaticity of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts under conditions of I_f block by ivabradine. TTX further reduced HR in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts to very low levels (< 50 bpm; Fig. 6B). Since part of this residual automaticity could come from impulse generation in extranodal sites (Fig. 5), we directly investigated SAN automaticity by OM of the pacemaker impulse following pharmacologic inhibition of I_f (Fig. 6C), or concomitant I_f and $I_{Na(TTX)}$ blockade (Fig. 6D). Blockade of $I_{Na(TTX)}$ in SANs perfused with ivabradine arrested impulse generation in 4/6 $Ca_v1.3^{-/-}$ and 3/6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ preparations (Fig. 6D). Very low rates of spontaneous depolarization were recorded in 5 SAN/Atria preparations from $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice still presenting residual automaticity (<40 bpm, Fig. 6D). In contrast, ablation of SAN-VGCCs did not affect the impulse conduction time to the atria (Supplementary Fig. 3). Similarly, ivabradine and TTX did not prolong the impulse conduction times to the right and left atria (Supplementary Fig. 3). These data indicate that while SAN-VGCCs strongly affected SAN automaticity, they were not directly involved in impulse conduction from the SAN to atria.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs impaired the generation of SAN impulse in the SAN (Figs. 3, 4). Hence, we recorded automaticity of isolated SAN cells from wild-type and mutant mice (Fig. 7). Individual $Ca_v1.3$ knockout and concomitant ablation of the two SAN-VGCCs similarly slowed basal automaticity of isolated SAN cells and reduced the slopes of linear and exponential phases of the diastolic depolarization (Fig. 7A–D, Supplementary Table 1). In addition, individual $Ca_v1.3$ or concomitant SAN-VGCCs ablation hyperpolarized the action potential

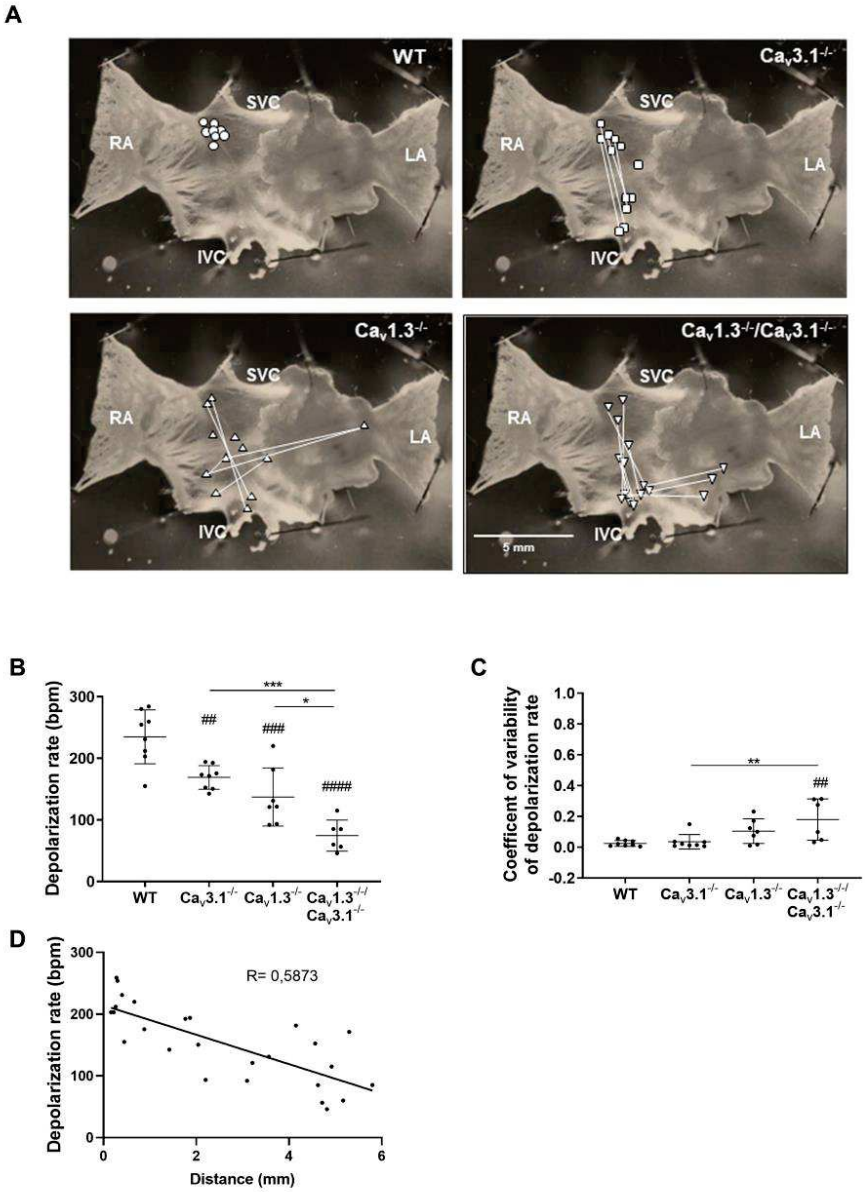


Figure 4. SAN automaticity and distribution of pacemaker leading sites in SAN/atria from wild-type and mutant mice. (**A**) Sample snapshots of SAN/atria preparations with points showing the position of the pacemaking leading region. Connecting lines indicate alternating leading regions in in the same mutant SAN. (**B**) Comparison between atrial rates of n = 8 wild-type, n = 8 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations. (**C**) Coefficient of variability of atrial rates from the same mice as in (**B**). Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD. (**D**) Linear regression between the rate from the leading region and the distance from the normal leading region recorded in wild-type preparations. (#) Indicates comparison with wild-type.

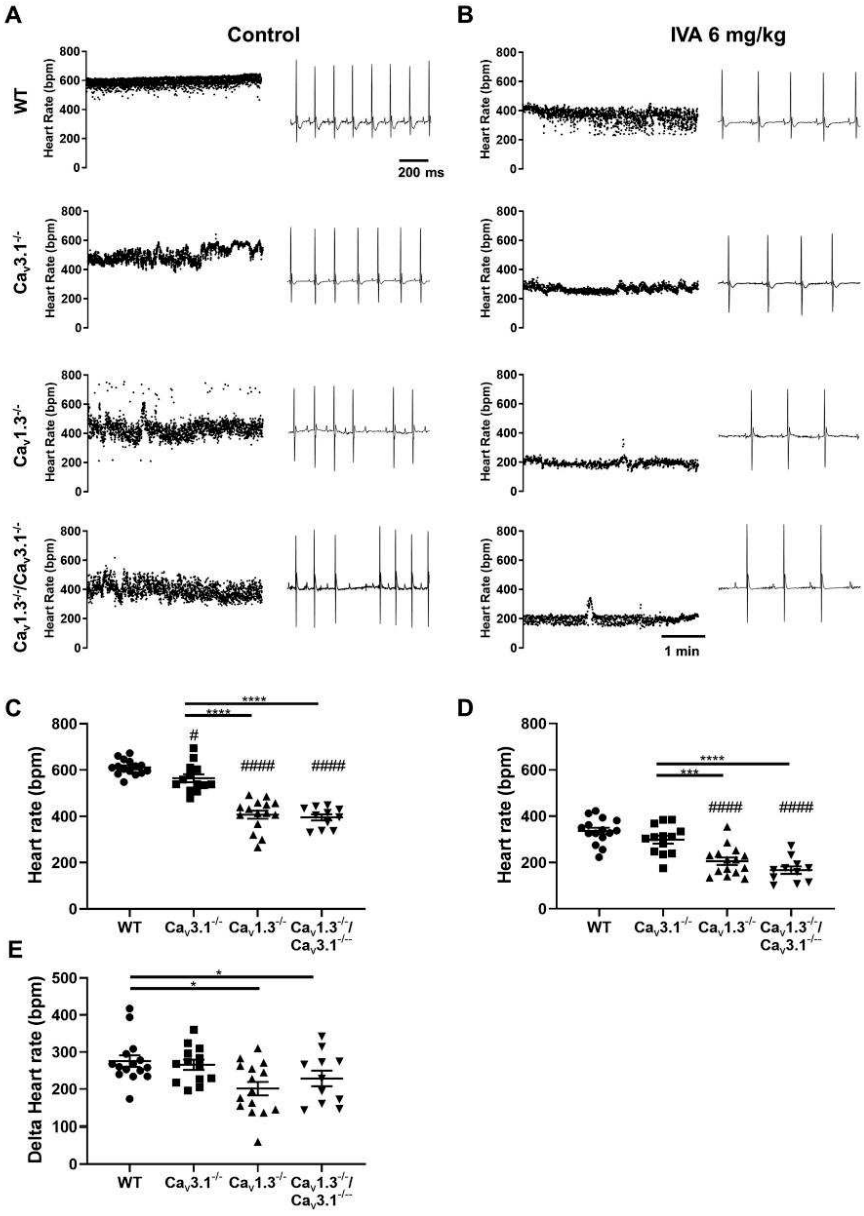


Figure 5. Heart rates in wild-type and mutant mice under pharmacologic inhibition of I_f. Dot plots of heart rates and sample ECGs recorded before (**A**) and after (**B**) intraperitoneal (IP) injection of ivabradine (IVA, 6 mg/kg) in n = 14 *WT*, n = 9 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 10 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 14 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice. Plotted averaged heart rates measured before (**C**) and after (**D**) IVA injection in all genotypes. (**E**) Relative effect of IVA 6 mg/kg (I.P. injection) on heart rates measured in all genotypes. In panels (**C**, **D**) and (**E**), whiskers indicate mean ± the SEM. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. (#) Indicates comparison with wild-type mice.

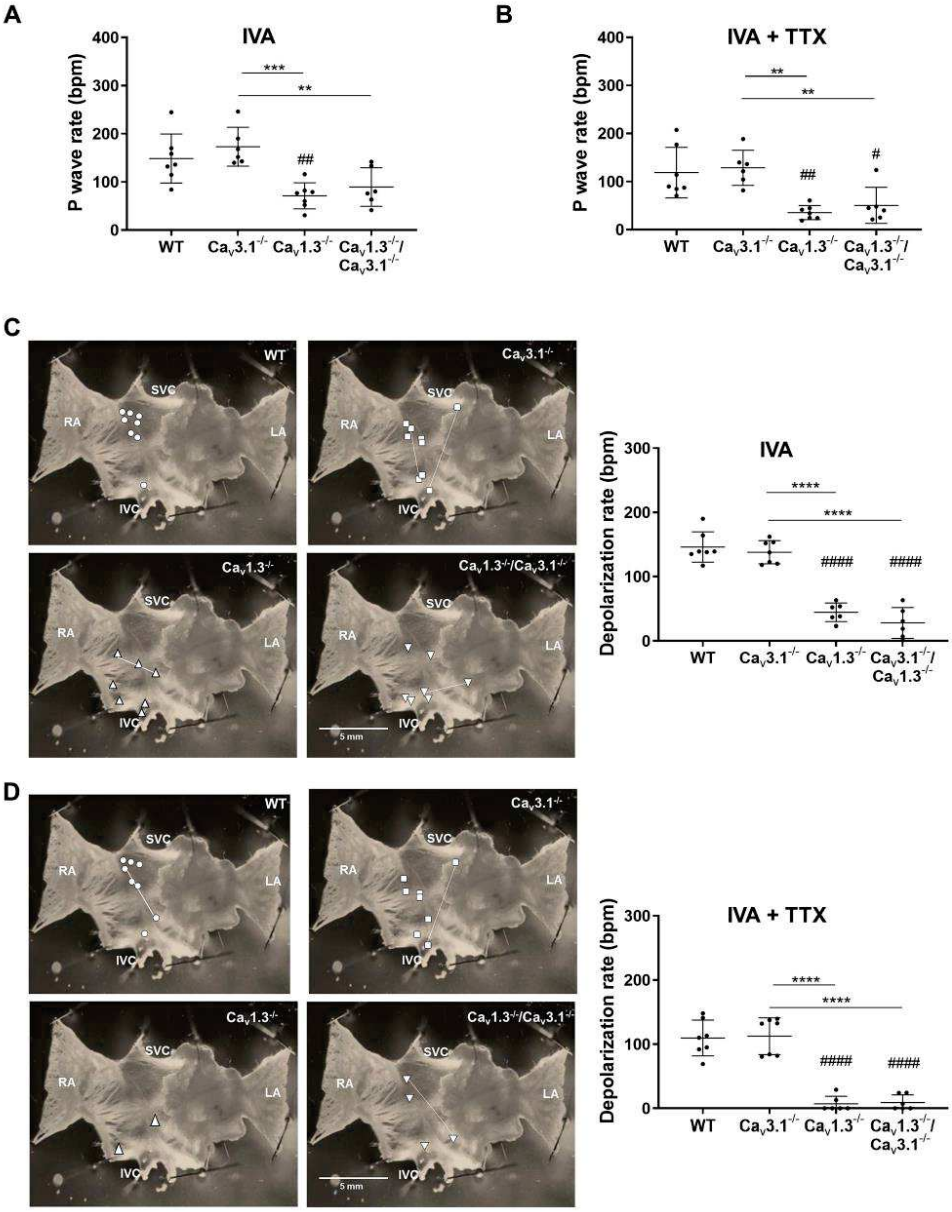


Figure 6. Pacemaker arrest by concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ in $Ca_v1.3^{-/-}$ SAN/atria preparations. (**A**) Atrial rates of n = 7 *WT*, n = 6 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated Langendorff hearts under ivabradine (IVA, 10 μM) perfusion. (**B**) Atrial rates of isolated hearts under IVA 10 μM + TTX 100 nM perfusion. (**C**) Sample snapshots of the localization of leading regions under IVA 10 μM perfusion (left panels) and averaged rates of depolarization in n = 7 *WT*, n = 7 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 6 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations. (**D**) Same representation as in (**C**) with leading region in IVA 10 μM + TTX 100 nM perfusion. Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD. (#) Indicates comparison with wild-type.

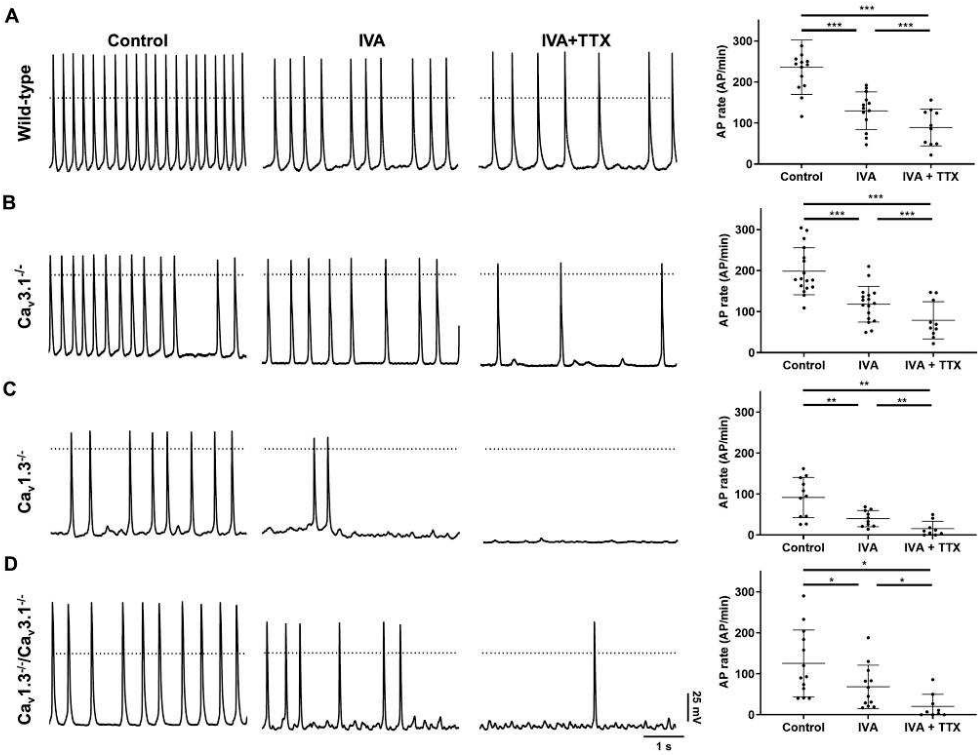


Figure 7. Pacemaker activity in SAN cells from wild-type and mutant mice. Sample perforated-patch action potential recordings (left panels) of SAN cells under control conditions (control), following perfusion of IVA (3 μM) and concomitant perfusion of IVA and TTX (IVA + TTX, 50 nM), from wild-type (**A**, n = 14), $Ca_v3.1^{-/-}$ (**B**, n = 17), $Ca_v1.3^{-/-}$ (**C**, n = 11) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (**D**, n = 13). The left panels show corresponding averaged rates of action potentials. Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± SD.

threshold to more negative voltages in comparison to wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, without affecting the cells' maximum diastolic potential (Supplementary Table 1). Superfusion of ivabradine alone significantly slowed automaticity of SAN cells isolated from all genotypes (Fig. 7A–D). Ivabradine also significantly hyperpolarized the maximum diastolic potential in SAN cells (Supplementary Table 2), indicating that I_f contributed to set the equilibrium between inward and outward currents at the end of the repolarization phase. Concomitant perfusion of ivabradine and TTX further slowed automaticity in comparison to ivabradine alone in SAN cells from all genotypes (Fig. 7A–D). Concomitant perfusion of ivabradine and TTX slowed but did not arrest automaticity of wild-type or $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 7A,B). In contrast with $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells and consistently with OM recordings, concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ slowed the rate of spontaneous action potentials by ~ 80% and arrested automaticity in 2 out of 9 of $Ca_v1.3^{-/-}$ and in 3 out of 9 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated SAN cells (Fig. 7C,D). We tested also if concomitant selective pharmacologic inhibition of SAN-VGCCs affected automaticity of SAN cells similarly to genetic ablation. To obtain selective inhibition of $Ca_v1.3$ channels, we employed SAN cells from mice carrying dihydropyridine (DHP) resistant $Ca_v1.2$ channels ($Ca_v1.2^{DHP-/-}$, see Ref.[36]). In $Ca_v1.2^{DHP-/-}$ mice, $Ca_v1.2$ channels have been rendered insensitive to DHP by knock-in a point mutation in the channel DHP binding site[36]. Concomitant perfusion of the T-type selective inhibitor TTA-A_2 and nifedipine slowed the rate of spontaneous action potentials by ~ 90% (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Table 3). These data indicate that the strong reduction of SAN automaticity following ablation of SAN-VGCCs could not be explained by a remodeling phenomenon of the pacemaker mechanism in mice globally lacking SAN-VGCCs.

Concomitant ablation of SAN-VGCCs reduced late diastolic local Ca^{2+} release linked to the *coupled clock* pacemaker mechanism. Experiments on SAN/Atria preparations and recordings of isolated SAN cells from $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under concomitant inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ showed

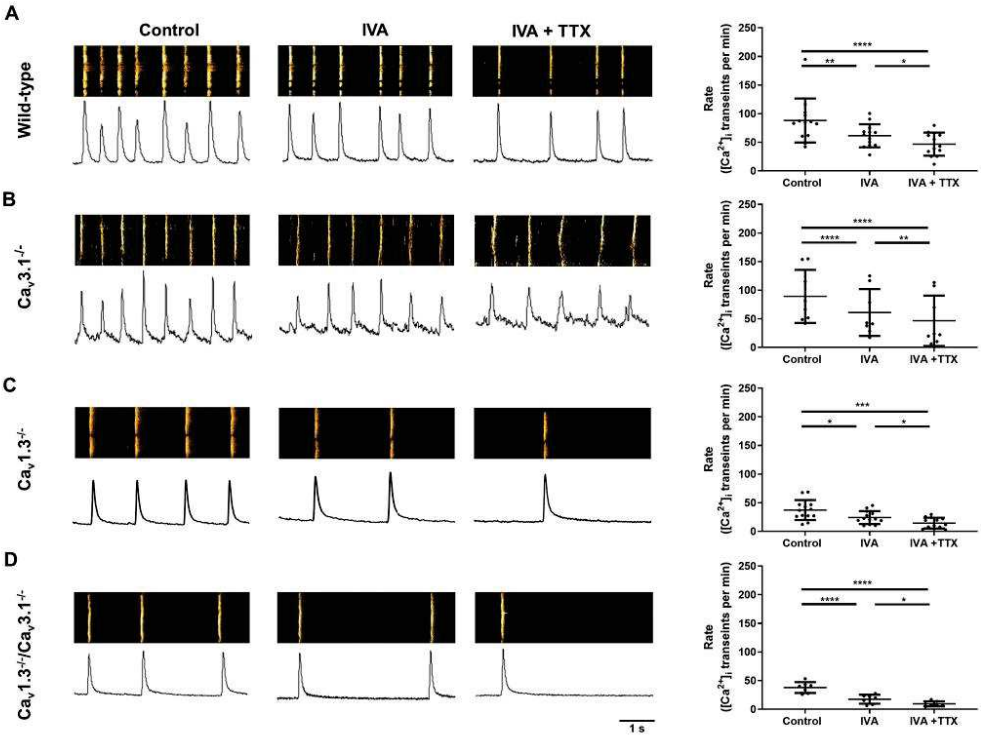


Figure 8. Confocal line scan imaging of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) release during pacemaker activity of SAN cells from wild-type and mutant mice. Confocal line scan (left) images (top, left), corresponding sample traces of the time integral (bottom, left) and averaged frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients (right) of SAN cells form wild-type (**A**, n = 13), $Ca_v3.1^{-/-}$ (**B**, n = 8), $Ca_v1.3^{-/-}$ (**C**, n = 13) and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ (**D**, n = 7) loaded with Fluo-4 and perfused with Tyrode's solution (left) or IVA 3 μM (center) or IVA 3 μM + TTX 50 nM (right). Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multiple comparisons test. Whiskers indicate mean ± the SD.

arrest of automaticity. This observation suggests that, following ablation of SAN-VGCCs, functional association between RyR-dependent LCRs underlying the *Ca^{2+} clock* and L-type $Ca_v1.2$ channels could not consistently generate residual pacemaking under these conditions. We previously showed that $Ca_v1.3$ channels positively regulate the frequency and synchrony of LCRs during pacemaking[27]. Therefore, we recorded RyR-dependent Ca^{2+} release and $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in wild-type and mutant SAN cells to investigate the consequences of SAN-VGCCs ablation on late diastolic LCRs, which constitute one hallmark of the *coupled clock* pacemaker mechanism[15]. In line with recordings of spontaneous action potentials, the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients was similar in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, but lower than in wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ counterparts (Fig. 8A–D). Concomitant blockade of I_f and $I_{Na(TTX)}$ reduced the frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients by 62% in $Ca_v1.3^{-/-}$ and by 74% in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells, leading to very low averaged rates of automaticity (< 15 bpm; Fig. 8C,D).

We then analyzed LCRs events occurring in the late diastolic interval[3]. These late diastolic LCRs generate an ascending phase (ramp) of the average fluorescence ratio (F/F_0) signal (Fig. 9A)[27,37]. We observed reduced events of late diastolic LCRs in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 9A). The reduction in LCRs was reflected in diminished time integral of the ramp phase in comparison to wild-type cells (Fig. 9B). The slope of the ramp phase is indicative of the degree of synchronization of late LCRs and constitute an important parameter of the capability of the *coupled clock* to promote diastolic NCX1 activity hence pacemaking[15,16,38]. The slope of the ramp phase was strongly decreased in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells (Fig. 9C). We did not record significant differences in the time integral or ramp slope between $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. In conclusion, these observations indicated that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupted late diastolic LCRs, which constitute an important component of the *coupled clock* pacemaker mechanism.

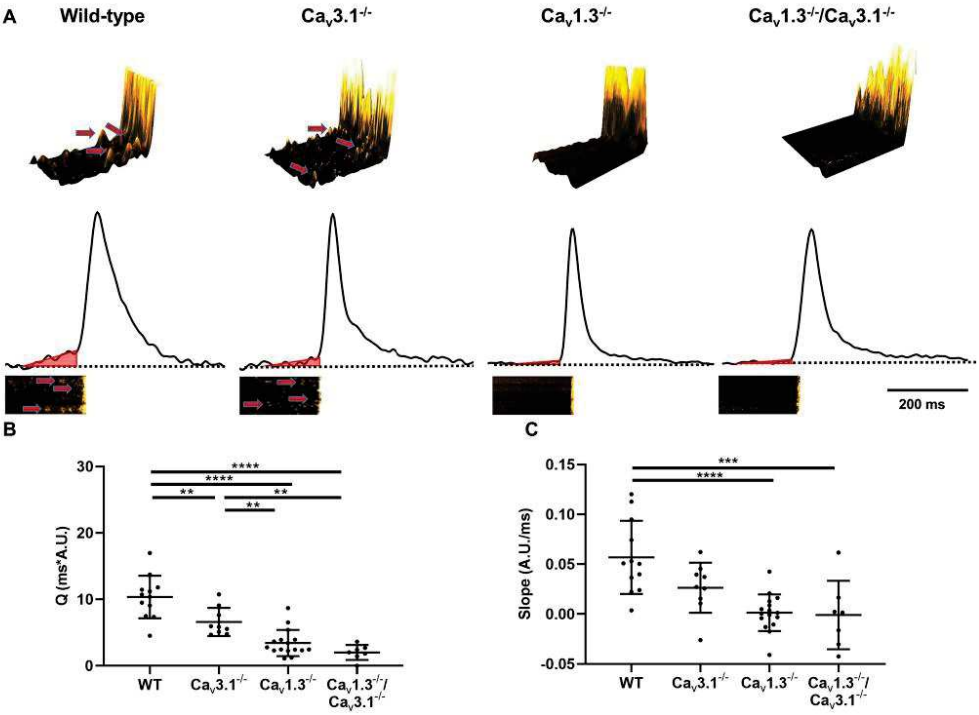


Figure 9. Genetic ablation of SAN-VGCCs suppresses late diastolic local $[Ca^{2+}]_i$ release (LCR). (**A**, top panel). Samples of 3D reconstruction of recordings of the change in fluorescence ratio F/F_0 recorded 150 ms before the spontaneous cell-wide $[Ca^{2+}]_i$ release transient. Red arrows indicate late diastolic LCR. (**A**, bottom panel). Corresponding samples traces of the time integral of the fluorescence ratio F/F_0 signal recorded from wild-type, $Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated SAN cells. Red triangles represent the zone considered for calculating the slope and time integral of ramp phases, which reflects late diastolic LCR. The ramp phase was calculated starting 150 ms before the peak of the $[Ca^{2+}]_i$ transient. The bottom insets show corresponding 2D line scan images. Time integral (Q) of F/F_0 (**B**) and slope (**C**) of the ramp phase in n = 12 wild-type, n = 9 $Ca_v3.1^{-/-}$, n = 16 $Ca_v1.3^{-/-}$ and n = 7 $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ isolated SAN cells. A.U. indicate arbitrary units of the F/F_0 ratio. Statistics: one-way ANOVA followed by Holm–Sidak multi comparison test.

We previously showed that ablation of $Ca_v1.3$ channels preserves the SR Ca^{2+} load[27]. Therefore, we challenged wild-type and mutant SAN cells by rapid dumping of $[Ca^{2+}]_i$ using caffeine (10 mM). The caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transient of wild-type and $Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells showed comparable amplitudes (F/F_0, Supplementary Fig. 5A). In contrast, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells showed increased F/F_0 value in comparison to wild-type counterparts (Supplementary Fig. 5A). The decay time (τ) of the caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transient did not differ between wild-type and mutant SAN cells, indicating similar activities of SERCA and NCX in all genotypes tested (Supplementary Fig. 5B). Finally, we compared the total number of LCRs, irrespectively from their relative position in diastolic interval, as we described previously[27]. We did not record significant differences in the total number of diastolic LCRs under perfusion of ivabradine (3 μM) or concomitant perfusion of ivabradine (3 μM) and TTX (50 nM) in comparison to control conditions in all the genotypes tested (Supplementary Fig. 5C), indicating that inhibition of I_f or $I_{Na(TTX)}$ did not alter the function of RyRs. Taken together, these results show that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts late diastolic LCRs underlying the SAN *coupled clock* mechanism of pacemaking.

Discussion

Impact of the study. In this study, we show for the first time that concomitant ablation of SAN-VGCCs disrupts heart automaticity and suppresses late diastolic LCRs, which are an important factor of the *coupled clock* pacemaker mechanism in SAN cells. SAN-VGCCs ablation compromised SAN impulse generation, impaired atrioventricular conduction and destabilized ventricular rhythmicity. Particularly, we show that $Ca_v3.1$ channels play an important role in stabilizing atrial and ventricular rhythmicity in isolated $Ca_v1.3^{-/-}$ hearts. We also report

that in both $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN/atria preparations, residual pacemaker activity is predominantly generated in peripheral nodal and extranodal sites by f-channels and TTX-sensitive Na^+ channels.

The physiological role of SAN-VGCCs in orchestrating heart automaticity has been long overlooked. Therefore, designs of many currently published studies and review articles on physiopathology of heart automaticity do not still properly factor SAN-VGCCs. The original formulation of the *coupled clock* model of pacemaking ascribed predominant roles for f-channels and spontaneous voltage-independent diastolic LCRs, respectively as key components of the *membrane clock* and of the Ca^{2+} *clock* in the generation of the diastolic depolarization[3,5,15]. In this model, cooperation between f-channels and NCX1 was the dominant electrogenic mechanism in the generation of diastolic depolarization. The contribution of I_{CaT} was predicted to be reduced in comparison to that of I_f and NCX1[15]. Another important factor in the *coupled clock* is high basal intracellular cAMP concentrations and elevated activity of protein kinases that contribute to mutual entrainment between diastolic RyR-dependent Ca^{2+} release underlying the Ca^{2+} *clock* and the *membrane clock*. The earlier *coupled clock* model by Maltsev and Lakatta[15] also included activation of I_{CaL} at positive voltages corresponding to the action potential threshold[15]. Thus, while I_{CaL} did not directly contribute to the generation of diastolic depolarization per se, Ca^{2+} entry via I_{CaL} during the action potential phase was necessary to restore SR Ca^{2+} load to prime a new cycle of diastolic LCRs[15]. However, this *coupled clock* model did not include evidence showing that SAN cells express both $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL}, activating at positive systolic voltages, as well as $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}, activating at diastolic voltages and supplying Ca^{2+} entry during diastolic depolarization[24]. In addition, further work from our group showed that Ca^{2+} entry via $Ca_v1.3$ channels control RyR-dependent Ca^{2+} release by triggering and synchronizing diastolic LCRs events[27]. The most recent version of the *coupled clock* model of pacemaking by Lyaskov et al.[16] includes a more negative activation threshold for activation of I_{CaL}[16] (−40 mV, see Ref.[39]), than in the previous version of the model[15]. Numerical simulations using the Lyaskov et al. *coupled clock* model[16] predict that this negative shift of I_{CaL} activation induces functional cooperativity, between LCRs, NCX1 and I_{CaL} to generate exponential phase of diastolic depolarization (referred to as "ignition phase"). The present study is consistent with this model. However, and importantly for the current models of pacemaking, we now provide direct genetic and functional evidence showing that the mechanism of SAN dysfunction following ablation of SAN-VGCCs involves suppression of Ca^{2+} entry in the voltage range spanning the diastolic depolarization and impairment of generation of late diastolic LCRs. Thus, SAN-VGCCs provides an important regulatory mechanism in sustaining the Ca^{2+} *clock* during normal pacemaking by promoting the *coupled clock*. In addition, our study shows that coupling between $Ca_v1.2$ and random LCRs generated by RyR-dependent Ca^{2+} release cannot consistently generate viable SAN automaticity following ablation of SAN-VGCCs and inhibition of f-channels. In this context, our data indicate that future models of pacemaking should include $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ channels as additional mechanisms of coupling between the Ca^{2+} *clock* and the *membrane clock*, and distinguish between functional roles of $Ca_v1.3$ from $Ca_v1.2$ channel isoforms.

Role of SAN-VGCCs in Ca^{2+} entry in SAN diastolic depolarization. Concomitant ablation of SAN-VGCCs abolished I_{Ca} at voltages spanning the range between ~ −60 mV and ~ −35 mV corresponding to diastolic depolarization in wild-type cells (Fig. 1, Supplementary Table 1). Previous work showed that $Ca_v3.1$ channels activate at more negative voltages than $Ca_v1.3$ channels[7,24]. However, their limited steady-state availability at the maximum diastolic potential (~90% steady-state inactivation at −60 mV)[24] predicts smaller $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} than $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}[23]. This suggests more limited contribution of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} to SAN diastolic depolarization than of $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL}. Furthermore, beside the higher steady-state availability of $Ca_v1.3$ than $Ca_v3.1$ at diastolic voltages, $Ca_v1.3$ channels are also an essential molecular component of the sustained inward Na^+ current (I_{st})[40], which constitute an additional contributor to diastolic depolarization[41]. It is thus possible that, while $Ca_v1.3$ channels contribute to the pacemaker mechanisms via I_{CaL}/I_{st} inward currents[24,40] and generation of LCRs (Ref.[35] and this study), the predominant contribution of $Ca_v3.1$ channels to SAN pacemaking is regulation of LCRs connected to the *coupled clock* mechanism. In line with this hypothesis, we did not observe additivity between individual ablation of $Ca_v1.3$ and concomitant ablation of SAN-VGCCs on atrial rate in *vivo* (Fig. 2), as well as in Langendorff-perfused intact hearts (Fig. 3). Thus, another important factor determining similar HRs in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice is the convergence of SAN-VGCCs to a common downstream intracellular effector: the generation of diastolic LCRs (Fig. 9). This hypothesis is also consistent with previous evidence on the role of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} in generating diastolic LCRs in atrial subsidiary pacemaker myocytes[37]. However, isolated SAN/atria from $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts showed significantly slower intrinsic automaticity than that of $Ca_v1.3^{-/-}$ counterparts (Fig. 4). The discrepancy between the additivity of the effect of SAN-VGCCs in isolated $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts and SAN/atria preparations and the observations in vivo could be explained by the action of the autonomic nervous system and by physiological mechanoelectrical feedback stimulating pacemaking in working hearts in vivo.

Role of SAN-VGCCs in SAN automaticity. The observation that $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts ex vivo present with junctional atrial and ventricular rhythmicity rather than SAN rhythm led us to investigate automaticity using isolated SAN/atria preparations. Both and $Ca_v3.1^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}$ presented with shift of the leading pacemaker sites from central to peripheral SAN areas (Fig. 4). Pacemaker shift is a well-known phenomenon in which groups of automatic cells eventually become dominant following manoeuvres that reduce intrinsic spontaneous activity of previously dominant leading sites (see Ref.[42], for review). Shift is due to heterogeneity of expression of ion channels[42] and proteins regulating the Ca^{2+} *clock* in the SAN[43,44]. Recent work has shown that normal SAN impulse is initiated in the leading site by HCN4-expressing cells showing heterogeneous Ca^{2+} signals[45]. Indeed, these cells present with spontaneous LCRs, or LCRs followed by cell-wide Ca^{2+} transients. These cells can entrain the activity of neighbouring cells or cluster of cells. Different clusters can synchronize their activity

to promote the emergence of the SAN impulse[45]. It is thus tempting to speculate that deletion of SAN-VGCCs disrupts LCRs in these clusters shifting the pacemaker leading site towards peripheral or extranodal regions that are less sensitive to $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ deletion and LCRs suppression. These secondary pacemaker regions, such as the peripheral SAN or the posterior nodal extension close to the inferior *vena cava*[31] express high levels of the f-channel protein HCN4, which would constitute an effective backup pacemaker mechanism. This hypothesis is consistent with our observation that, in comparison with $Ca_v1.3^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN-atria preparations more frequently showed alternating impulse initiation in the SAN and in extranodal sites (Fig. 4), and with our previous observations that pacemaker cells of the mouse peripheral SAN show strong HCN4 positive immunostaining[34]. In addition, both cardiac $Na_v1.5$ and TTX-sensitive Na_v isoforms have been shown to participate to pacemaking in the peripheral SAN and to intranodal conduction in mice[8] and humans[10]. It is thus possible that peripheral leading sites express elevated densities of I_{Na} necessary for impulse conduction within the SAN or from the SAN to the atria[10]. Consistent with this hypothesis, ablation of SAN-VGCCs did not affect the SAN-to-atria conduction time (Supplementary Fig. 3). Shift of pacemaker site to peripheral SAN could explain why concomitant inhibition of I_f and TTX-sensitive I_{Na} arrests automaticity in the majority of $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN-atria preparations (Fig. 6).

In conclusion, our data show for the first time that SAN-VGCCs are necessary to maintain atrial automaticity in the central SAN region. Concomitant ablation of SAN-VGCCs reduced the HR in vivo by ~ 200 bpm, which corresponds to ~ 30% of the HR measured in wild-type mice under control conditions (Fig. 2). This value is similar to that recorded in wild-type mice under I_f inhibition by ivabradine (~ 200 bpm). However, the HR in some $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice under I_f inhibition was lower than 100 bpm, which corresponds to a reduction of more than 85%, in comparison to the initial HR measured in wild-type mice under control condition. Nevertheless, this residual pacemaking was sufficient to sustain heart function in mice. These data underscore the importance of SAN-VGCCs in the generation of SAN automaticity.

Role of SAN-VGCCs in impulse conduction and ventricular rhythmicity. We found a clearly additive impact on AV conduction between individual $Ca_v1.3$ and concomitant SAN-VGCCs ablation (Figs. 2, 3). More hyperpolarized diastolic voltages in some AVN cells and in myocytes of His'–Purkinje system than in the SAN could explain this additive effect. This would increase the steady-state availability of $Ca_v3.1$-mediated I_{CaT} in the conduction system. Consequently, dissociated rhythms observed in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice can be explained also by loss of depolarization reserve provided by I_{CaT} in $Ca_v1.3^{-/-}$ mice. The high incidence of complete heart block with dissociated atrial and ventricular rhythms in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts underscores the importance of $Ca_v3.1$ channels in atrioventricular conduction (Fig. 3). Shifting of leading pacemaker sites from primary sites to extranodal locations can explain atrial ectopic and atrial rhythmicity observed in Langendorff-perfused $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts (Supplementary Fig. 2). This impairment of primary SAN automaticity by ablation of SAN-VGCCs could promote ventricular arrhythmia by unmasking the activity of automatic junctional proarrhythmic sites. In particular, complete heart block in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts may favor ventricular arrhythmia by unmasking junctional or ventricular ectopic sites. Indeed, we showed previously that episodes of SAN pauses or AV block precede spontaneous initiation of ventricular tachycardia in mice carrying heart specific expression of non-conductive f-channels (HCN4-AYA mice)[34]. A compensatory effect by autonomic tone may explain the absence of ventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo. In this respect, we showed that atropine suppressed ventricular tachycardia in HCN4-AYA mice[34]. Thus, blockade of I_{KACh} activation by atropine could be an additional factor suppressing ventricular arrhythmia in $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice in vivo under inhibition of the autonomic nervous system (Fig. 1). In conclusion, our data show that expression of $Ca_v3.1$ channels is essential to maintain normal atrial and ventricular rhythmicity in hearts lacking $Ca_v1.3$.

Role of SAN-VGCCs in the pacemaker mechanism. Beside SAN-VGCCs and I_f, other plasmalemmal ion channels, as well as RyR-dependent Ca^{2+} release can contribute to the generation of diastolic depolarization and pacemaker activity. We thus hypothesized that the residual pacemaker activity observed in vivo in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice or in ex vivo mutant hearts and SAN/atrial preparations under ivabradine was sustained by TTX-sensitive Na_v1 channels and RyR-dependent Ca^{2+} release.

Previous work has showed that I_f inhibition by ivabradine reduces diastolic LCRs, by slowing the *coupled clock* in a rate-dependent way[46]. In particular, the *coupled clock* model of pacemaking predicts that I_f inhibition will slow pacemaker activity, which in turn, will reduce LCRs via the *coupled clock* mechanism[16,46]. In relation to the present study, it is possible that slowing of diastolic depolarization by I_f inhibition delays activation of SAN-VGCCs contributing to reduction in diastolic LCRs in wild-type SAN cells. However, our data show that deletion of SAN-VGCCs leads already to strong reduction in late diastolic LCRs with consequent disruption of the *coupled clock* mechanism (Fig. 9). The evidence that inhibition of I_f and $I_{Na(TTX)}$ does not reduce the total LCRs number in mutant cells despite further slowing of pacemaking is consistent with our hypothesis that ablation of SAN-VGCCs disrupts the normal functioning of the *coupled clock*. Consequently, it is possible that the role of I_f in residual pacemaker activity observed following concomitant ablation of SAN-VGCCs differs from that observed in wild-type cells, in which the *coupled clock* mechanism is intact before I_f blockade. This hypothesis is in line with our observation that the relative heart rate slowing induced by I_f inhibition is higher in $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ than in wild-type mice (Fig. 5). This differential contribution of I_f to pacemaking in wild-type and mutant hearts underscores the importance of the depolarization reserve in the intact SAN, in which I_f, beside contributing to cellular automaticity, prevents tissue hyperpolarization imposed by atrial electrotonic load[6,47].

Our data show that inhibition of $I_{Na(TTX)}$ arrests automaticity in 50% of isolated SAN/atria preparations and in 40% individual $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ SAN cells. This observation indicates that TTX-sensitive Na_v1 channels are the predominant mechanisms sustaining pacemaker activity after ablation of SAN-VGCCs

and pharmacologic inhibition of I_f (Figs. 6, 7). We may expect that spontaneous RyR-dependent Ca^{2+} release could remain viable under these conditions, as predicted by the *coupled clock* model[3]. Indeed, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ hearts express functional $Ca_v1.2$ channels and could ensure proper SR Ca^{2+} load to activate spontaneous Ca^{2+} *clock* mechanism[3]. This hypothesis would be in line with our observation that deletion of $Ca_v1.3$ channels does not reduce the SR Ca^{2+} load[27]. However, our data show that SAN-VGCCs are a key factor to generate and control diastolic LCRs underlying the *coupled clock* mechanism of pacemaking. Several combined factors may explain the poor efficiency of $Ca_v1.2$ channels in maintaining proper pacemaking, when functionally associated with I_f and spontaneous RyR-dependent Ca^{2+} release. Beside the more positive threshold for activation of $Ca_v1.2$ in comparison to $Ca_v1.3$ channels, $Ca_v1.3$-mediated I_{CaL} activation kinetics is faster and inactivation is lower than that of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} in SAN cells[24]. Differences in channels' kinetics probably render $Ca_v1.3$ more adaptable to generation of rhythmic activity in SAN cells than $Ca_v1.2$ channels. Moreover, the membrane distribution of $Ca_v1.2$ channels differs from that of $Ca_v1.3$ in mouse SAN cells. Indeed, we showed previously that while $Ca_v1.2$ immunoreactivity is evenly distributed along the plasma membrane, $Ca_v1.3$ immunoreactivity shows well-defined co-staining with RyR2[48]. This differential subcellular distribution of $Ca_v1.3$ channels may facilitate control of LCRs in the diastolic phase in comparison to $Ca_v1.2$ channels that reside in a less-favorable spatial position to generate LCRs. In line with this hypothesis, we previously showed that ablation of $Ca_v1.3$ channels abolishes synchronous recruitment of diastolic RyR-dependent Ca^{2+} releasing sites under adrenergic activation of pacemaker activity[27]. Loss of synchronous recruitment intervenes despite the significant negative shift in the threshold for activation of $Ca_v1.2$-mediated I_{CaL} induced by adrenergic activation (~ 5 mV)[27].

It is possible that residual RyR-dependent Ca^{2+} release was effective in the fraction of SAN/atria preparations still generating automaticity at very low rates, probably in cooperation with TRPC[14] and TRPM4[12] channels. Nevertheless, our results show that expression of SAN-VGCCs is necessary to ensure pacemaking, via Ca^{2+} entry and efficient generation of diastolic LCRs in diastolic depolarization; two functions that sole expression of $Ca_v1.2$ channels could not facilitate.

Conclusions

Our study demonstrates that co-expression of functional $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$ SAN-VGCCs is essential for generating normal heart automaticity and atrioventricular conduction, as well as to stabilize atrial and ventricular rhythmicity and generating SAN pacemaker activity. We show that normal heart automaticity is reliant on expression of SAN-VGCCs to generate diastolic inward current and Ca^{2+} entry to activate the Ca^{2+} *clock* pacemaker mechanism during normal pacemaking. As a corollary, our study indicates that functional association of L-type $Ca_v1.2$ channels and f-channels is not sufficient to maintain normal SAN pacemaking and heart automaticity. Finally, our study provides new mechanistic insight into congenital and autoimmune SAN dysfunction and atrioventricular block based on SAN-VGCC loss-of-function[29,30,49].

Methods

Mutant mice harboring genetic ablation of VGCCs ($Ca_v3.1^{-/-}$, $Ca_v1.3^{-/-}$ and $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$) were generated in the IGF animal facility from C57B/6J genetic background. $Ca_v1.3^{-/-}/Ca_v3.1^{-/-}$ mice were obtained by crossing C57B/6J $Ca_v1.3^{-/-}$ [27] with C57B/6J $Ca_v3.1^{-/-}$[25] mice. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US national Institute of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and European directives (2010/63/EU). The experimental procedure was approved by the Ethical committee of the University of Montpellier and the French Ministry of agriculture (protocol no: 2017010310594939). Animals were housed in individual cages with free access to food and water and were exposed to 12-h light/dark reverse cycles (light, 20:00 h to 8:00 h) in a thermostatically controlled room.

ECG recordings in mice. Telemetric ECG recordings in freely-moving mice were performed as previously described[23,34,35]. Briefly, mice were anesthetized using gas anesthesia with 2% isoflurane (Forene, Abbott, UK). An ETA-F10 telemetric transmitter (Data Sciences International) was placed subcutaneously along the animal's back. Transmitter's wire electrodes were placed in DII derivation against the heart axis. Advil (ibuprofen, 7 mL/L) was added to the drinking water for 4 days after implantation to prevent post-operative pain. Mice were left to recover for 10 days before experiments. ECG signals were recorded by employing a telemetric receiver connected to an analog-to-digital conversion acquisition system. Analysis was performed off-line using the Dataquest A.R.T. software (Data Sciences International). Heart rates (HR) were determined from RR intervals and atrial rates from PP intervals, under control conditions or following recording of 4-h baseline to evaluate drugs effects. All drugs were administered by intraperitoneal (IP) injection. Mean HR values were calculated by analyzing periods of 5 min at different time points corresponding to the peak effect of the drug. ECG parameters were measured by employing ECG Auto 1.5.7 software (EMKA Technologies).

Langendorff-perfused hearts. ECG recordings in Langendorff perfused mouse hearts were performed as previously described[35]. Mice were deeply anesthetized by IP injection of 0.3 mL of solution constituting Ketamine (0.1 mg/g, Imalgène) and Xylazine (0.01 mg/g, Rompun 2%, Bayer), followed by a second injection of Pentobarbital (150 µL Euthasol Vet in 10 mL NaCl physiological solution). To avoid blood clots in the heart, we injected 0.5 mL of NaCl solution containing Heparin (25,000 U.I). Hearts were removed via thoracotomy when the tail sensitivity test become negatives. Excised hearts with aortic cannula were quickly mounted on a Langendorff apparatus (Isolated heart system; EMKA Technologies) at a pressure of 70–80 mm Hg imposed by the working heart with normal Tyrode's solution containing (mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 1.8; Hepes, 5 and glucose, 5.5 (pH adjusted to 7.4 with NaOH). Perfused hearts were immersed in the water-jacked bath and maintained at 36 °C. The ECG was continuously recorded by two Ag–AgCl electrodes; the first was placed on

the epicardial side of the right atrium close to the SAN area and the second near the ventricular apex. The heart rate was allowed to stabilize for at least 30 min before perfusion of drugs. ECG parameters were measured with ECG Auto 3.3.3.8 software (EMKA Technologies).

Intact SAN/atria preparations. We obtained SAN-atria preparations from excised hearts as previously described[50]. Briefly, we placed the entire SAN/atrial preparation in pre-warmed (36 °C) Tyrode's solution containing heparin (10 U/mL). We used a stereomicroscope (SZX16; Olympus) with low magnification (7×) to transilluminate and visualize directly the isolated SAN/atria preparation. We identified the SAN region using the superior and inferior vena cava, the *crista terminalis*, and the interatrial septum as landmarks. The SAN/atrial preparation including right and left atria (RA and LA) was pinned to the bottom of an optical chamber (Fluorodish, FD35PDL-100; WPI) coated with ~ 2 mm of clear Sylgard (Sylgard 184 Silicone elastomer kit; Dow Corning). To maintain the SAN in a flat plane, we pinned the right and left atrium using entomology needles.

Optical mapping of membrane voltage in SAN/atria preparations. Optical mapping of SAN impulse was performed as described previously[51]. SAN/atria preparation was loaded with the voltage-sensitive dye indicator Di-4-ANEPPS in Tyrode's solution with 10 μM Biotium for at least 30 min at room temperature (20–22 °C). The preparation was placed on an agitated plate to maintain proper oxygenation of the tissue and load it uniformly. The tissue was then washed 3 times in dye-free Tyrode's solution. The SAN/atria preparation was continously perfused at 34–36 °C. A MICAM Ultima-L complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera (100 × 100-pixel CMOS sensor, 10 × 10 mm, SciMedia) was used to achieve high speed optical mapping of membrane voltage (2 ms/frame). The camera was mounted on a THT microscope, with two objectives (2 × and 1.6 ×) to generate a field view of 12.5 × 12.5 mm. The excitation light source consisted in a 150-W halogen light system with built-in shutter (SciMedia). The filter set included a 531/50-nm excitation filter, 580-nm dichroic mirror, and 580 long-pass emission filter. Blebbistatin (1.5–5 μM; Tocris Bioscience) was used to prevent imaging artifacts due to tissue contraction. We usually limited our recording times to 32.768 s (16,384 frames at 2 ms per frame) to preserve the tissue from dye phototoxicity. Data were analyzed using the BrainVision Analyzer software (BrainVision).

Isolation of SAN cells. SAN pacemaker cells were isolated as previously described[52]. Briefly, SAN tissue was immersed into solution containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 50 mM taurine, 5.5 mM D-glucose, 1 mg/mL BSA, and 5 mM Hepes–NaOH (adjusted to pH 6.9 with NaOH) for 4 min. The tissue was then transferred into the low-Ca^{2+} solution containing purified collagenase and protease (Liberase medium Thermolysin concentration; 229 U/mL; Roche). 1.9 U/mL elastase (Boehringer Mannheim). Digestion was carried out for 15–20 min at 36 °C. To stop the digestion process, the SAN was washed in a medium containing 70 mM L-glutamic acid, 20 mM KCl, 80 mM KOH, 10 mM KH_2PO_4, 10 mM taurine, 1 mg/mL BSA, and 10 mM Hepes–KOH (adjusted to pH 7.4 with KOH). Single cells were isolated from the SAN tissue by manual agitation using a flame-forged Pasteur's pipette in KB solution at 36 °C. To recover the automaticity of the SAN cells, Ca^{2+} was gradually reintroduced in the cells' storage solution to a final concentration of 1.8 mM[52].

Patch-clamp recordings of SAN cells. Patch-clamp recordings of SAN cells was carried out as previously described[52]. Cells were harvested in custom-made chambers with glass bottoms for cell attachment. Cells were then superfused with Tyrode's solution warmed at 36 °C before recording. Voltage-gated Ca^{2+} currents (I_{Ca}) were recorded using standard whole cell patch-clamp configuration as previously described[23,24]. Extracellular recording solution contained (mM): 135 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10 4-aminopyridine (4-AP), 1 $MgCl_2$, 0.03 tetrodotoxin (TTX), 1 g/L Glucose, 2 $CaCl_2$, 10 Hepes, (adjusted to pH = 7.2 with TEAOH). Electrodes had a resistance of 3 MΩ and were filled with a solution containing (in mM): 125 Cs^+-aspartate, 20 TEA-Cl, 1.2 $CaCl_2$, 5 Mg-ATP, 0.1 Li_2-GTP, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH)[23,24]. Seal resistances were in the range of 2–5 GΩ. Pacemaker activity of SAN cells was recorded under perforated patch conditions by adding 50 μM β-Escin to the pipette intracellular solution[23,35]. Patch-clamp electrodes had a resistance of 3–5 MΩ when filled with an intracellular solution containing (in mM): 130 K^+-aspartate, 10.0 NaCl; 2 ATP-Na^+ salt, 6.6 creatine phosphate, 0.1 GTP-Mg^{2+}, 0.04 $CaCl_2$ (pCa = 7.0), and 10.0 HEPES–KOH (adjusted to pH 7.2 with KOH). Perfusion of pre-warmed (36 °C) experimental solutions was performed by using a multi-MPRE8 heating pen (Cell Micro Controls,). Data acquisition was performed using a Multiclamp 700A patch-clamp amplifier connected to Digidata 1550B interface (Molecular Devices).

Ca^{2+} imaging in isolated SAN cells. Confocal Ca^{2+} imaging of SAN cells was performed as previously described[27]. SAN cells were harvested in a glass Fluorodish (FD3510-100, WPI), coated overnight with laminin (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) for 1 h before recordings. SAN cells loading was performed by removing the bath solution and replacing it by Tyrode's solution containing the Ca^{2+} indicator CAL-520 (1 μM, from a stock solution containing DMSO/Pluronic F-127 0.13%; Invitrogen) during 25 min at room temperature. Images were obtained with confocal microscopy (Zeiss LSM 780), by scanning SAN cells with an Argon laser in line-scan configuration. To avoid phototoxicity we generally recorded the SAN cells at a line rate of 1.53 or 3.78 ms to obtain 10,000 lines. Fluorescence was excited at 488 nm and emissions were collected at > 505 nm. A 63 × oil immersion objective was used to record $[Ca^{2+}]_i$ in isolated SAN myocytes. We suppressed the background noise and analyzed the time-courses of Ca^{2+} fluorescence by pClamp software (ver.10.6.2.2, Molecular Devices). $[Ca^{2+}]_i$ transients and LCRs were analyzed using ImageJ software 8. To identify the ramp phase of the $[Ca^{2+}]_i$

transient, we integrated the F/F_0 signal 150 ms before the peak of the cell-wide transient and calculated the slope of this phase using Clampfit (ver. 10.7).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism 8.0 (GraphPad Software). Data are represented as mean ± the standard error of the mean (SEM) or the standard error (SD) as indicated. Statistical tests used in each experiment are specified throughout the figure legends. Statistical significance was defined as: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.05$, $p<0.01$, $^{***}p<0.001$ and $^{****}p<0.0001$.

Received: 29 July 2020; Accepted: 15 October 2020
Published online: 03 November 2020

References

1. Mangoni, M. E. & Nargeot, J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol. Rev.* **88**, 919–982 (2008).
2. DiFrancesco, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455–472 (1993).
3. Lakatta, E. G., Maltsev, V. A. & Vinogradova, T. M. 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**, 659–673. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206078 (2010).
4. Monfredi, O., Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda)* **28**, 74–92. https://doi.org/10.1152/physiol.00054.2012 (2013).
5. Yaniv, Y., Lakatta, E. G. & Maltsev, V. A. From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. *Front. Physiol.* **6**, 28. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00028 (2015).
6. DiFrancesco, D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* **106**, 434–446. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.208041 (2010).
7. Mangoni, M. E. *et al.* Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **90**, 38–63 (2006).
8. Lei, M. *et al.* Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.* **559**, 835–848 (2004).
9. Maier, S. K. *et al.* An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3507–3512 (2003).
10. Li, N. *et al.* Impaired neuronal sodium channels cause intranodal conduction failure and reentrant arrhythmias in human sinoatrial node. *Nat. Commun.* **11**, 512. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14039-8 (2020).
11. Baruscotti, M., Westenbroek, R., Catterall, W. A., DiFrancesco, D. & Robinson, R. B. The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na^{+} channel. *J. Physiol.* **498**(Pt 3), 641–648 (1997).
12. Demion, M., Bois, P., Launay, P. & Guinamard, R. TRPM4, a Ca(2+)-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc. Res.* **73**, 531–538 (2007).
13. Sah, R. *et al.* Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3037–E3046. https://doi.org/10.1073/pnas.1311865110 (2013).
14. Ju, Y. K. *et al.* Store-operated Ca^{2+} influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ. Res.* **100**, 1605–1614 (2007).
15. Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Synergism of coupled subsarcolemmal Ca^{2+} clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H594–H615. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01118.2008 (2009).
16. Lyashkov, A. E., Behar, J., Lakatta, E. G., Yaniv, Y. & Maltsev, V. A. Positive feedback mechanisms among local Ca releases, NCX, and ICaL ignite pacemaker action potentials. *Biophys. J.* **114**, 2024. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.024 (2018).
17. Vinogradova, T. M. *et al.* Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ. Res.* **94**, 802–809 (2004).
18. Maltsev, V. A. & Lakatta, E. G. Dynamic interactions of an intracellular Ca^{2+} clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* **77**, 274–284. https://doi.org/10.1093/cvr/cvm058 (2008).
19. Bogdanov, K. Y., Vinogradova, T. M. & Lakatta, E. G. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)–Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ. Res.* **88**, 1254–1258 (2001).
20. Marionneau, C. *et al.* Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.* **562**, 223–234 (2005).
21. Bers, D. M. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ. Res.* **90**, 14–17 (2002).
22. Zhang, Z. *et al.* Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation* **112**, 1936–1944 (2005).
23. Mangoni, M. E. *et al.* Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ. Res.* **98**, 1422–1430 (2006).
24. Mangoni, M. E. *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5543–5548 (2003).
25. Marger, L. *et al.* Functional roles of Ca(v)1.3, Ca(v)3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels (Austin)* **5**, 251–261 (2011).
26. Zhang, Q. *et al.* Expression and roles of Cav1.3 (alpha1D) L-type Ca(2)+ channel in atrioventricular node automaticity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 194–202. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.002 (2011).
27. Torrente, A. G. *et al.* L-type Cav1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca^{2+} release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc. Res.* **109**, 451–461. https://doi.org/10.1093/cvr/cvw006 (2016).
28. Li, Y. *et al.* Increasing T-type calcium channel activity by beta-adrenergic stimulation contributes to beta-adrenergic regulation of heart rates. *J. Physiol.* **596**, 1137–1151. https://doi.org/10.1113/JP274756 (2018).
29. Baig, S. M. *et al.* Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat. Neurosci.* **14**, 77–84. https://doi.org/10.1038/nn.2694 (2011).
30. Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., Laghi-Pasini, F. & Boutjdir, M. Autoimmune channelopathies as a novel mechanism in cardiac arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 521–535. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.61 (2017).
31. Dobrzynski, H. *et al.* Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ. Res.* **93**, 1102–1110 (2003).
32. DiFrancesco, D. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* **324**, 470–473 (1986).

33. DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. & Tromba, C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* **377**, 61–88 (1986).
34. Mesirca, P. *et al.* Cardiac arrhythmia induced by genetic silencing of "funny" (f) channels is rescued by GIRK4 inactivation. *Nat. Commun.* **5**, 4664. https://doi.org/10.1038/ncomms5664 (2014).
35. Mesirca, P. *et al.* G protein-gated IKACh channels as therapeutic targets for treatment of sick sinus syndrome and heart block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E932-941. https://doi.org/10.1073/pnas.1517181113 (2016).
36. Sinnegger-Brauns, M. J. *et al.* Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca^{2+} channels. *J. Clin. Investig.* **113**, 1430–1439 (2004).
37. Huser, J., Blatter, L. A. & Lipsius, S. L. Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol.* **524**(Pt 2), 415–422 (2000).
38. Bogdanov, K. Y. *et al.* Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca^{2+} releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Circ. Res.* **99**, 979–987 (2006).
39. Vinogradova, T. M. *et al.* Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ. Res.* **87**, 760–767 (2000).
40. Toyoda, F. *et al.* CaV1.3 L-type Ca^{2+} channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na^{+} current. *Sci. Rep.* **7**, 7869. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08191-8 (2017).
41. Mitsuiye, T., Shinagawa, Y. & Noma, A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ. Res.* **87**, 88–91 (2000).
42. Boyett, M. R., Honjo, H. & Kodama, I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* **47**, 658–687 (2000).
43. Musa, H. *et al.* Heterogeneous expression of Ca(2+) handling proteins in rabbit sinoatrial node. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 311–324 (2002).
44. Lyashkov, A. E. *et al.* Calcium cycling protein density and functional importance to automaticity of isolated sinoatrial nodal cells are independent of cell size. *Circ. Res.* **100**, 1723–1731 (2007).
45. Bychkov, R. *et al.* Synchronized cardiac impulses emerge from heterogeneous local calcium signals within and among cells of pacemaker tissue. *JACC Clin. Electrophysiol.* **6**, 907–931. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2020.06.022 (2020).
46. Yaniv, Y. *et al.* New evidence for coupled clock regulation of the normal automaticity of sinoatrial nodal pacemaker cells: bradycardic effects of ivabradine are linked to suppression of intracellular Ca(2)(+) cycling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.026 (2013).
47. Yanagihara, K. & Irisawa, H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch.* **385**, 11–19. https://doi.org/10.1007/BF00583909 (1980).
48. Christel, C. J. *et al.* Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels in mouse sinoatrial node. *J. Physiol.* **590**, 6327–6342. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.239954 (2012).
49. Liaqat, K. *et al.* Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani families reveals a clinical significance. *J. Hum. Genet.* **64**, 153–160. https://doi.org/10.1038/s10038-018-0542-8 (2019).
50. Neco, P. *et al.* Paradoxical effect of increased diastolic Ca^{2+} release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **126**, 392–401. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075382 (2012).
51. Torrente, A. G. *et al.* Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 9769–9774. https://doi.org/10.1073/pnas.1505670112 (2015).
52. Mangoni, M. E. & Nargeot, J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I(f)) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.* **52**, 51–64 (2001).

Acknowledgements
We thank Ira Cohen (University of New York, Stony Brook NY), Alicia D'Souza (University of Manchester, UK) and Jean-Yves Le Guennec (University of Montpellier) for critical reading of the manuscript. We thank Jörg Striessnig (University of Innsbruck, Austria) for support and Hee-Sup Shin (Institute for Basic Science, South Korea), for sharing the original $Ca_v3.1^{-/-}$ genotype. We also thank the staff of the iExplore BioCampus Facility of Montpellier for breeding the mouse lines.

Author contributions
M.B., P.M., E.T., I.B., J.L., A.G.T., L. F., L.T., performed experiments. J.N. and S.B.L. provided intellectual contribution. P.M. and M.E.M. designed the study and wrote the manuscript. All the authors provided critical reading of the manuscript.

Funding
The IGF group is a member of the Laboratory of Excellence *Ion Channel Science and Therapeutics* supported by a grant from ANR (ANR-11-LABX-0015). Research supported by the *Fondation pour la Recherche Medicale* "Physiopathologie Cardiovasculaire" (DPC20171138970 to M.E.M.), by the *Agence Nationale de Recherche* (ANR-15-CE14-0004-01 to M.E.M.) and the *Fondation Leducq* (TNE FANTASY 19CVD03 to Matteo E. Mangoni and Peter J. Mohler).

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-76049-7.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. or M.E.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

Bibliographie

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.

An, W., Bowlby, M., Betty, M., Cao, J., Ling, H., Mendoza, G., Hinson, J., Mattsson, K., Strassle, B., Trimmer, J., et al. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. Nature *403*.

Anumonwo, J., Freeman, Kwok, W., and Kass, R. (1992). Delayed rectification in single cells isolated from guinea pig sinoatrial node. The American Journal of Physiology *262*.

Baruscotti, M., Westenbroek, R., Catterall, W., DiFrancesco, D., and Robinson, R. (1997). The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na+ channel. The Journal of Physiology *498 (Pt 3)*.

Baruscotti, M., Bucchi, A., and DiFrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. Pharmacology & Therapeutics *107*.

Baudot, M., Torre, E., Bidaud, I., Louradour, J., Torrente, A.G., Fossier, L., Talssi, L., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., Mesirca, P., et al. (2020). Concomitant genetic ablation of L-type Cav1.3 (α1D) and T-type Cav3.1 (α1G) Ca2+ channels disrupts heart automaticity. Sci Rep *10*.

Baumann, L., Gerstner, A., Zong, X., Biel, M., and Wahl-Schott, C. (2004). Functional characterization of the L-type Ca2+ channel Cav1.4alpha1 from mouse retina.

Belardinelli, L., Shryock, J.C., Song, Y., Wang, D., and Srinivas, M. (1995). Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. The FASEB Journal *9*, 359–365.

Bidaud, I., Chung You Chong, A., Carcouet, A., Waard, S.D., Charpentier, F., Ronjat, M., Waard, M.D., Isbrandt, D., Wickman, K., Vincent, A., et al. (2020). Inhibition of G protein-gated K+ channels by tertiapin-Q rescues sinus node dysfunction and atrioventricular conduction in mouse models of primary bradycardia. Scientific Reports *10*.

Bogdanov, K.Y., Vinogradova, T.M., and Lakatta, E.G. (2001). Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na+-Ca2+ Exchanger: Molecular Partners in Pacemaker Regulation. Circulation Research *88*, 1254–1258.

Boyett, M.R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, M.R., Niwa, R., and Kodama, I. (1998). Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node. Am. J. Physiol. *275*, H1158-1168.

Boyett, M.R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, M.R., Niwa, R., and Kodama, I. (1999). Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. Am. J. Physiol. *276*, H686-698.

Brahmajothi, M., Morales, M., Reimer, K., and Strauss, H. (1997). Regional localization of ERG, the channel protein responsible for the rapid component of the delayed rectifier, K+ current in the ferret heart. Circulation Research *81*.

Brown, H.F., Giles, W., and Noble, S.J. (1977). Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. J. Physiol. (Lond.) *271*, 783–816.

Brown, H.F., Difrancesco, D., and Noble, S.J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? Nature *280*, 235–236.

Brown, H.F., Kimura, J., Noble, D., Noble, S.J., and Taupignon, A. (1984). The slow inward current, isi , in the rabbit sino-atrial node investigated by voltage clamp and computer simulation. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences *222*, 305–328.

Buraei, Z., and Yang, J. (2013). Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels.

Catterall (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. Annual Review of Cell and Developmental Biology *16*.

Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. Pharmacological Reviews *55*, 579–581.

Catterall, W.A., Lenaeus, M., and Gamal El-Din, T. (2020). Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. Annual Review of Pharmacology and Toxicology *60*.

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

Chandler, N., Aslanidi, O., Buckley, D., Inada, S., Birchall, S., Atkinson, A., Kirk, D., Monfredi, O., Molenaar, P., Anderson, R., et al. (2011). Computer three-dimensional anatomical reconstruction of the human sinus node and a novel paranodal area. Anat Rec (Hoboken) *294*, 970–979.

Chemin, J., Taiakina, V., Monteil, A., Piazza, M., Guan, W., Stephens, R., Kitmitto, A., Pang, Z., Dolphin, A., Perez-Reyes, E., et al. (2017). Calmodulin regulates Ca v 3 T-type channels at their gating brake.

Christel, C., and Lee, A. (2012). Ca2+-dependent modulation of voltage-gated Ca2+ channels.

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. (Lond.) *590*, 6327–6342.

Clark, R.B., Mangoni, M.E., Lueger, A., Couette, B., Nargeot, J., and Giles, W.R. (2004). A rapidly activating delayed rectifier K+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *286*, H1757–H1766.

Cribbs, L., Martin, B., Schroder, E., Keller, B., Delisle, B., and Satin, J. (2001). Identification of the t-type calcium channel (Ca(v)3.1d) in developing mouse heart.

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. Journal of Cardiovascular Electrophysiology *6*, 813–822.

De Mazière, A., Van Ginneken, A., Wilders, R., Jongsma, H., and Bouman, L. (1992). Spatial and Functional Relationship Between Myocytes and Fibroblasts in the Rabbit Sinoatrial Node.

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

DiFrancesco, D. (1981b). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. J. Physiol. (Lond.) *314*, 377–393.

DiFrancesco, D. (1982). The Current IK2 in Purkinje Fibres Reinterpreted and Identified with the Current IF in the SA Node. In Cardiac Rate and Rhythm: Physiological, Morphological and Developmental Aspects, L.N. Bouman, and H.J. Jongsma, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 69–91.

DiFrancesco, D. (1991). The contribution of the "pacemaker" current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. J Physiol *434*, 23–40.

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

DiFrancesco, D., and Camm, J.A. (2004). Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. Drugs *64*, 1757–1765.

DiFrancesco, D., and Mangoni, M. (1994). Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. The Journal of Physiology *474*, 473–482.

DiFrancesco, D., and Noble, D. (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences *307*, 353–398.

DiFrancesco, D., and Ojeda, C. (1980). Properties of the current if in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current iK, in Purkinje fibres. J. Physiol. (Lond.) *308*, 353–367.

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

DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M., and Tromba, C. (1986). Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. The Journal of Physiology *377*.

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

DiFrancesco Dario (2010). The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. Circulation Research *106*, 434–446.

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 *111*, 846–854.

Dolphin, A.C. (2012). Calcium channel auxiliary α2δ and β subunits: trafficking and one step beyond. Nature Reviews Neuroscience *13*, 542–555.

Ferron, L., Capuano, V., Deroubaix, E., Coulombe, A., and Renaud, J. (2002). Functional and molecular characterization of a T-type Ca(2+) channel during fetal and postnatal rat heart development.

Fox, A., Cahill, A., Currie, K., Grabner, C., Harkins, A., Herring, B., Hurley, J., and Xie, A. (2008). N- and P/Q-type Ca2+ channels in adrenal chromaffin cells. Acta Physiologica (Oxford, England) *192*.

Gasparini, S., and DiFrancesco, D. (1997). Action of the hyperpolarization-activated current (Ih) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. Pflugers Arch. *435*, 99–106.

Gauldie, J., Hanson, J.M., Rumjanek, F.D., Shipolini, R.A., and Vernon, C.A. (1976). The Peptide Components of Bee Venom. European Journal of Biochemistry *61*, 369–376.

Giles, W., and Noble, S.J. (1976). Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. The Journal of Physiology *261*, 103–123.

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

Grossman, J.I., and Delman, A.J. (1969). Serial P wave changes in acute myocardial infarction. Am. Heart J. *77*, 336–341.

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

Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, D., Rhodes, K., Trimmer, J., and Nerbonne, J. (2002). Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K+ currents. Circulation Research *90*.

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. The Journal of Physiology *395*, 233–253.

Haloui, M., Arnal, J.F., Pham, I., Gonzalez, W., Lyoussi, B., and Michel, J.B. (2000). [Functional compartmentation of the endocrine action of cardiac natriuretic peptides]. Ann. Endocrinol. (Paris) *61*, 32–40.

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

Han, X., Shimoni, Y., and Giles, W. (1995). A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. The Journal of General Physiology *106*.

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

Hell, J.W. (2010). β-Adrenergic Regulation of the L-Type Ca2+ Channel CaV1.2 by PKA Rekindles Excitement. Sci. Signal. *3*, pe33-pe33.

Honjo, H., Boyett, M., Kodama, I., and Toyama, J. (1996). Correlation between electrical activity and the size of rabbit sino-atrial node cells. The Journal of Physiology *496 (Pt 3)*.

Irisawa, H., and Seyama, I. (1966). The configuration of the P wave during mild exercise. Am. Heart J. *71*, 467–472.

Irisawa, H., Brown, H.F., and Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. Physiological Reviews *73*, 197–227.

Kalamajski, and Oldberg (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis.

Kodama, I., Nikmaram, M.R., Boyett, M.R., Suzuki, R., Honjo, H., and Owen, J.M. (1997). Regional differences in the role of the Ca2+ and Na+ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *272*, H2793–H2806.

Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D. (1995a). G beta gamma binds directly to the G protein-gated K+ channel, IKACh. The Journal of Biological Chemistry *270*.

Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirović, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1995b). The G-protein-gated atrial K + channel I KAch is a heteromultimer of two inwardly rectifying K + -channel proteins. Nature *374*, 135–141.

Krapivinsky, G., Gordon, E., Wickman, K., Velimirović, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D. (1995c). The G-protein-gated atrial K+ channel IKACh is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+)-channel proteins. Nature *374*.

Kurachi, Y., Nakajima, T., and Sugimoto, T. (1986). On the mechanism of activation of muscarinic K+ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. Pflugers Arch. *407*, 264–274.

Lakatta, E.G., Maltsev, V.A., and Vinogradova, T. (2010). A coupled SYSTEM of intracellular Ca2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. Circulation Research *106*.

Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers Arch. *61*, 291–332.

Lei, M., Honjo, H., Kodama, I., and Boyett, M.R. (2001). Heterogeneous expression of the delayed-rectifier K+ currents iK,r and iK,s in rabbit sinoatrial node cells. The Journal of Physiology *535*, 703–714.

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

Levitan, B.M., Ahern, B.M., Aloysius, A., Brown, L., Wen, Y., Andres, D.A., and Satin, J. (2021). Rad-GTPase contributes to heart rate via L-type calcium channel regulation. Journal of Molecular and Cellular Cardiology *154*, 60–69.

Lewis, T., Rothschild, M.A., and Starling, E.H. (1915). IV. The excitatory process in the dog's heart. Part II.- The ventricles. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character *206*, 181–226.

Linscheid, N., Logantha, S., Poulsen, P., Zhang, S., Schrölkamp, M., Egerod, K., Thompson, J., Kitmitto, A., Galli, G., Humphries, M., et al. (2019). Quantitative proteomics and single-nucleus transcriptomics of the sinus node elucidates the foundation of cardiac pacemaking.

Liu, G., Papa, A., Katchman, A.N., Zakharov, S.I., Roybal, D., Hennessey, J.A., Kushner, J., Yang, L., Chen, B.-X., Dangas, K., et al. (2020). Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. Nature *577*, 695–700.

Lolicato, M., Nardini, M., Gazzarrini, S., Möller, S., Bertinetti, D., Herberg, F.W., Bolognesi, M., Martin, H., Fasolini, M., Bertrand, J.A., et al. (2011). Tetramerization Dynamics of C-terminal Domain Underlies Isoform-specific cAMP Gating in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels*. Journal of Biological Chemistry *286*, 44811–44820.

Lyashkov, A.E., Behar, J., Lakatta, E.G., Yaniv, Y., and Maltsev, V.A. (2018). Positive Feedback Mechanisms among Local Ca Releases, NCX, and ICaL Ignite Pacemaker Action Potentials. Biophysical Journal *114*, 2024.

Maier, S.K.G., Westenbroek, R., Yamanushi, T., Dobrzynski, H., Boyett, M., Catterall, W., and Scheuer, T. (2003). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*.

Maltsev, V.A., and Lakatta, E.G. (2009). Synergism of coupled subsarcolemmal Ca2+ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology *296*.

Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2001). Properties of the hyperpolarization-activated current (If) in isolated mouse sino-atrial cells. Cardiovasc Res *52*, 51–64.

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

Mangoni, M., Fontanaud, P., Noble, P., Noble, D., Benkemoun, H., Nargeot, J., and Richard, S. (2000). Facilitation of the L-type calcium current in rabbit sino-atrial cells: effect on cardiac automaticity.

Mangoni, M., Striessnig, J., Platzer, J., and Nargeot, J. (2001). Pacemaker currents in mouse sino-atrial node pacemaker cells. Circulation 218–218.

Mangoni, M., 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. Progress in Biophysics and Molecular Biology *90*, 38–63.

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., Traboulsie, A., Leoni, A., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H., et al. (2006b). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. Circulation Research *98*.

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.

Meek, W.J., and Eyster, J. a. E. (1914). Experiments on the origin and propagation of the impulse in the heart. American Journal of Physiology-Legacy Content *34*, 368–383.

Mesirca, Bidaud, and Mangoni (2016a). Rescuing cardiac automaticity in L-type Cav1.3 channelopathies and beyond. The Journal of Physiology *594*.

Mesirca, P., Marger, L., Toyoda, F., Rizzetto, R., Audoubert, M., Dubel, S., Torrente, A., Difrancesco, M., Muller, J., Leoni, A., 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. The Journal of General Physiology *142*.

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. (2016b). 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., Fedorov, V., Hund, T., Torrente, A., Bidaud, I., Mohler, P., and Mangoni, M. (2021). Pharmacologic Approach to Sinoatrial Node Dysfunction. Annual Review of Pharmacology and Toxicology *61*.

Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., Van Rijen, H., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J., and Gros, D. (2004). Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. Cardiovascular Research *63*.

Mitsuiye, T., Shinagawa, Y., and Noma, A. (2000). Sustained Inward Current During Pacemaker Depolarization in Mammalian Sinoatrial Node Cells. Circulation Research *87*, 88–91.

Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., and Nargeot, J. (2000). Molecular and Functional Properties of the Human α1G Subunit That Forms T-type Calcium Channels *. Journal of Biological Chemistry *275*, 6090–6100.

Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation.

Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Müller, J., Stiess, 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.

Mr, B., H, H., and I, K. (2000). The Sinoatrial Node, a Heterogeneous Pacemaker Structure.

Nanou, E., and Catterall, W.A. (2018). Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. Neuron *98*, 466–481.

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

Nerbonne, J.M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K+ channel diversity in the mammalian myocardium. The Journal of Physiology *525 Pt 2*.

Nerbonne, J.M., and Kass, R.S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. Physiological Reviews *85*, 1205–1253.

Nerbonne, J.M., Nichols, C., Schwarz, T., and Escande, D. (2001). Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? Circulation Research *89*.

Nikmaram, M.R., Boyett, M.R., Kodama, I., Suzuki, R., and Honjo, H. (1997). Variation in effects of Cs+, UL-FS-49, and ZD-7288 within sinoatrial node. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology *272*, H2782–H2792.

Ning, L., Kalyanasundaram, A., Hansen, B., Artiga, E., Sharma, R., Abudulwahed, S., Helfrich, K., Rozenberg, G., Wu, P., Zakharkin, S., et al. (2020). Impaired neuronal sodium channels cause intranodal conduction failure and reentrant arrhythmias in human sinoatrial node. Nature Communications *11*.

Noble, D., and Tsien, R.W. (1968). The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. (Lond.) *195*, 185–214.

Noma, A., and Trautwein, W. (1978). Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. Pflugers Arch. *377*, 193–200.

Noma, A., Peper, K., and Trautwein, W. (1979). Acetylcholine-induced potassium current fluctuations in the rabbit sino-atrial node. Pflügers Archiv European Journal of Physiology *381*, 255–262.

Ono, K., Shibata, S., and Iijima, T. (2000). Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. The Journal of Physiology *524*.

Opthof, T. (1988). The mammalian sinoatrial node. Cardiovasc Drugs Ther *1*, 573–597.

Opthof, T., de Jonge, B., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (1987). Functional morphology of the mammalian sinuatrial node. Eur. Heart J. *8*, 1249–1259.

Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels.

Petit-Jacques, J., Bois, P., Bescond, J., and Lenfant, J. (1993). Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. Pflugers Arch. *423*, 21–27.

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.

Pond, A., Scheve, B., Benedict, A., Petrecca, K., Van Wagoner, D., Shrier, A., and Nerbonne, J. (2000). Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. The Journal of Biological Chemistry *275*.

Rh, A., Ae, B., J, T.-J., and Mj, J. (1981). Anatomico-electrophysiological Correlations in the Conduction System--A Review.

Rosati, B., Dun, W., Hirose, M., Boyden, P., and McKinnon, D. (2007). Molecular basis of the T- and L-type Ca2+ currents in canine Purkinje fibres.

Rubenstein, D.S., and Lipsius, S.L. (1989). Mechanisms of automaticity in subsidiary pacemakers from cat right atrium. Circulation Research *64*, 648–657.

Sanders, L., Rakovic, S., Lowe, M., Mattick, P.A.D., and Terrar, D.A. (2006). Fundamental importance of Na+-Ca2+ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node: Na+-Ca2+ exchange and pacemaking. The Journal of Physiology *571*, 639–649.

Sanguinetti, M., C, J., Me, C., and Mt, K. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel.

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., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M., et al. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca2+ channel null mice.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 9391–9396.

Severi, S., Fantini, M., Charawi, L.A., and DiFrancesco, D. (2012). An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. The Journal of Physiology *590*, 4483–4499.

Seyama, I. (1976). Characteristics of the rectifying properties of the sino-atrial node cell of the rabbit. J. Physiol. (Lond.) *255*, 379–397.

Shin, K.S., Rothberg, B.S., and Yellen, G. (2001). Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. J. Gen. Physiol. *117*, 91–101.

Shinagawa, Y., H, S., and A, N. (2000). The sustained inward current and inward rectifier K+ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. The Journal of Physiology *523 Pt 3*.

Sperelakis, N. (1994). Regulation of Calcium Slow Channels of Heart by Cyclic Nucleotides and Effects of Ischemia. In Advances in Pharmacology, Z.J. Bosnjak, and J.P. Kampine, eds. (Academic Press), pp. 1–24.

Stephenson, R.S., Atkinson, A., Kottas, P., Perde, F., Jafarzadeh, F., Bateman, M., Iaizzo, P.A., Zhao, J., Zhang, H., Anderson, R.H., et al. (2017). High resolution 3-Dimensional imaging of the human cardiac conduction system from microanatomy to mathematical modeling. Sci Rep *7*.

Stieber, J., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2004). Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. Trends in Cardiovascular Medicine *14*.

Stieber, J., Stöckl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., and Hofmann, F. (2005). Functional expression of the human HCN3 channel. The Journal of Biological Chemistry *280*.

Striessnig, J., and Koschak, A. (2008). Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca2+ channels with gene knockout models.

Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., and Tuluc, P. (2014). L-type Ca^{2+} channels in heart and brain. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling *3*, 15–38.

Tanabe, T., Beam, K., Powell, J., and Numa, S. (1988). Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA.

Tellez, J.O., Dobrzynski, H., Greener Ian, D., Graham Gillian, M., Laing, E., Honjo, H., Hubbard Simon, J., Boyett, M., and Billeter, R. (2006). Differential Expression of Ion Channel Transcripts in Atrial Muscle and Sinoatrial Node in Rabbit. Circulation Research *99*, 1384–1393.

Torrente, A.G., Zhang, R., Zaini, A., Giani, J.F., Kang, J., Lamp, S.T., Philipson, K.D., and Goldhaber, J.I. (2015). Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium–calcium exchanger knockout mice. PNAS *112*, 9769–9774.

Torrente, A.G., Mesirca, P., Neco, P., Rizzetto, R., Dubel, S., Barrere, C., Sinegger-Brauns, M., Striessnig, J., Richard, S., Nargeot, J., et al. (2016). L-type Cav1.3 channels regulate

ryanodine receptor-dependent Ca2+ release during sino-atrial node pacemaker activity. Cardiovasc. Res. *109*, 451–461.

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: Responses of I_{st} to ISO and ACh. British Journal of Pharmacology *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.

Trautwein, W., and Dudel, J. (1958). Zum Mechanismus der Membranwirkung des Acetylcholin an der Herzmuskelfaser. Pflugers Arch. *266*, 324–334.

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. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression *1446*, 419–425.

Van Borren, M.M.G.J., Verkerk, A.O., Wilders, R., Hajji, N., Zegers, J.G., Bourier, J., Tan, H.L., Verheijck, E.E., Peters, S.L.M., Alewijnse, A.E., et al. (2010). Effects of muscarinic receptor stimulation on Ca2+ transient, cAMP production and pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells. Basic Research in Cardiology *105*, 73–87.

Van der Heyden, M., Tj, W., and T, O. (2005). Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca2+ channels.

Van eif, V., Stefanovic, S., Van Duijvenboden, K., Bakker, M., Wakker, V., De Gier-de Vries, C., Zaffran, S., Verkerk, A., Boukens, B., and Christoffels, V. (2019). Transcriptome analysis of mouse and human sinoatrial node cells reveals a conserved genetic program. Development (Cambridge, England) *146*.

Vassalle, M. (1966). Analysis of cardiac pacemaker potential using a “voltage clamp” technique.

Verheijck, E.E., van Kempen, M.J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongsma, H.J., and Bouman, L.N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. Cardiovasc. Res. *52*, 40–50.

Verheijck E. Etienne, Wessels Andy, van Ginneken Antoni C. G., Bourier Jan, Markman Marry W. M., Vermeulen Jacqueline L. M., de Bakker Jacques M. T., Lamers Wouter H., Opthof Tobias, and Bouman Lennart N. (1998). Distribution of Atrial and Nodal Cells Within the Rabbit Sinoatrial Node. Circulation *97*, 1623–1631.

Vinogradova, T., Zhou, Y., Bogdanov, K., Yang, D., Kuschel, M., Cheng, H., and Xiao, R. (2000). Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation.

Vinogradova, T., Zhou, Y., Maltsev, V., Lyashkov, A., Stern, M., and Lakatta, E. (2004). Rhythmic ryanodine receptor Ca2+ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. Circulation Research *94*.

Weidmann, S. (1951). Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. J. Physiol. (Lond.) *115*, 227–236.

Welsby, P., Wang, H., Wolfe, J., Colbran, R., Johnson, M., and Barrett, P. (2003). A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca2+/calmodulin-dependent kinase II.

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

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

Wickman, K., Krapivinsky, G., Corey, S., Kennedy, M., Nemec, 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.

Wilders, R. (2007). Computer modelling of the sinoatrial node. Medical & Biological Engineering & Computing *45*.

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

Xu, H., Guo, W., and Nerbonne, J.M. (1999). Four Kinetically Distinct Depolarization-activated K+ Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. J Gen Physiol *113*, 661–678.

Xu, X., Vysotskaya, Z.V., Liu, Q., and Zhou, L. (2010). Structural Basis for the cAMP-dependent Gating in the Human HCN4 Channel. J Biol Chem *285*, 37082–37091.

Yang, Z.K., Boyett, M.R., Janvier, N.C., McMorn, S.O., Shui, Z., and Karim, F. (1996). Regional differences in the negative inotropic effect of acetylcholine within the canine ventricle. The Journal of Physiology *492*, 789–806.

Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., and Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature *425*, 200–205.

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. Pharmacological Reviews *67*, 821–870.

Zaza, A., Robinson, R.B., and DiFrancesco, D. (1996). Basal responses of the L-type Ca2+ and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. J Physiol *491*, 347–355.