



Développement et caractérisation d'un modèle cellulaire cardiaque humain de cardiomyopathie arythmogène

Jean-Baptiste Reisqs

► To cite this version:

Jean-Baptiste Reisqs. Développement et caractérisation d'un modèle cellulaire cardiaque humain de cardiomyopathie arythmogène. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1036 . tel-04013254

HAL Id: tel-04013254

<https://theses.hal.science/tel-04013254>

Submitted on 3 Mar 2023

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.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1036

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 18/03/2022, par :

Jean-Baptiste Reisqs

Développement et Caractérisation d'un modèle cellulaire cardiaque humain de cardiomyopathie arythmogène

Devant le jury composé de :

BERNUS Olivier	Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
CHARPENTIER Flavien	Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes	Rapporteur
GANDJBAKHCH Estelle	Maitre de Conférence, Practicien Hospitalier CHU salpêtrière	Rapporteuse
BAETZ Delphine	Maitre de Conférence, Université de Lyon	Examinatrice
RICHARD Sylvain	Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier	Examineur
CHEVALIER Philippe	Professeur des Universités-Practicien Hospitalier, Université de Lyon	Directeur de thèse
BEAUVARGER Philippe	Responsable de laboratoire Sanofi, Chilly-Mazarin	Invité

Université Claude Bernard –LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne: Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne: Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen: M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur: M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice: Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur: M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur: M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur: Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur: M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur: M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur: M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice: Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur: Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur: M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur: M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Les travaux présentés, dans le cadre de cette thèse, ont été réalisés au Laboratoire de Physiologie et Médecine Expérimental du cœur et des muscles (PhyMedExp, INSERM U1046) en collaboration avec l'Institut NeuroMyoGène (INMG, INSERM U1217) et SANOFI (Recherche et développement Chilly-Mazarin). Ces travaux ont été financés par le groupe SANOFI.

J'adresse mes premiers remerciements au Pr Jacques Mercier, directeur du laboratoire PhyMedExp, pour son accueil et m'avoir permis de réaliser ma thèse au laboratoire.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr Philippe Chevalier et du Dr Sylvain Richard. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour leur confiance et leur suivi tout au long de cette thèse.

A Philippe, malgré nos divergences en termes footballistiques (allez les Verts), nous avons réussi à collaborer pour mener à bien ce beau projet. Merci pour l'invitation également au Groupama stadium pour le derby. Le match n'était pas top mais il y avait du bon champagne. Je n'oublierais pas également votre phrase, presque, gravée dans le marbre : « ce sont des petits cons de biologistes qui vont m'apprendre à faire mon métier ».

A Sylvain, je te remercie chaleureusement pour avoir accueilli un doctorant un peu abandonné à Montpellier. Tu as réussi à amener un si grand soleil dans le déroulement de cette thèse par ta bienveillance, ta sympathie et ton apport scientifique toujours avisé. J'émetts tout de même mon veto pour tes blagues... Tu as été une personne majeure dans le bon déroulement de cette thèse et je pense sincèrement que beaucoup d'encadrants de thèse devraient prendre exemple sur toi.

Je tiens à exprimer également ma sincère gratitude aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de recherche.

Au Pr Olivier Bernus pour avoir accepté d'être le président du jury lors de ma soutenance de thèse.

Au Pr Estelle Gandjbakhch et au Dr Flavien Charpentier d'avoir accepté de consacrer du temps à la correction de mon manuscrit de thèse en tant que rapporteurs. Merci pour leurs commentaires avisés et leurs encouragements.

Au Dr Delphine Baetz pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur et pour ses commentaires. Je vous remercie pour votre disponibilité.

A Philippe Beauverger, je te remercie d'avoir toujours continué à suivre ce projet, malgré la distance avec SANOFI et leur politique en termes de Recherches et développement. J'en profite également pour remercier Véronique Briand, pour avoir suivi mon début de thèse. Je vous remercie pour votre confiance.

Au cours de ces trois ans de thèse au laboratoire j'ai rencontré de très bonnes personnes que je tiens à également remercier. Je vous laisse un message particulier à vous tous, désolé pour ceux que je vais oublier à l'instant présent, promis je me rattraperai.

Table des matières

Liste des abréviations.....	7
Liste des Figures et Tableaux	10
Résumé /abstract.....	12
A. Revue de la littérature	14
I. Fonction et troubles du rythme cardiaque	15
1. Structure du cœur.....	15
2. Mécanismes de la contraction	17
3. Couplage excitation-contraction	19
4. Les disques intercalaires	20
5. Activité électrique cardiaque	26
6. Troubles du rythme cardiaque	29
II. La cardiomyopathie arythmogène	33
1. Aspect Physiopathologique.....	33
2. Aspect clinique	35
3. Aspect génétique.....	36
4. Pathogénèse	40
5. Voie de signalisation impliquée dans l'adipogenèse.....	42
6. Source cellulaire des adipocytes	44
7. Hypothèse de Transdifférenciation	45
8. Traitement et prévention de la CA.....	47
III. Les cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes induites (iPSC)	48
1. Les cellules souches pluripotentes	48
2. Les cellules souches pluripotentes induites.....	49
3. hiPSC-CM dans l'étude des troubles du rythme	57
B. Objectif de travail.....	62
C. Méthodologie	65
I. Modèle Expérimental	66
1. Les cardiomyocytes issus d'hiPSC	66
II. Caractérisation génétique des hiPSC-CM.....	68
1. Dissociation enzymatique des hiPSC-CM	68
2. RT qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reactions	68
III. Caractérisation électrophysiologique des hiPSC-CM.....	72
1. Le patch clamp.....	72
2. Imagerie calcique.....	74
3. Étude des propriétés contractiles.....	75
IV. Caractérisation morphologique des hiPSC-CM	76
1. Microscopie Électronique à Transmission	76
V. Analyses statistiques.....	76
D. Résultats	77
Étude I : Caractérisation morphologique par microscopie électronique à transmission.....	78
Étude II : Développement et caractérisation fonctionnelle du modèle DSC2 hiPSC-CM.....	83
Étude III : Implication de la voie PPAR γ dans le remodelage électrophysiologique	106

Étude IV : Étude préliminaire des effets cellulaires de l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	116
<i>E. Discussion</i>.....	123
I. Les hiPSC-CM comme modèle d'étude de la cardiomyopathie arythmogène ?	125
II. Les hiPSC-CM comme outil d'amélioration de traitements préventifs et curatifs des patients ?	128
III. Limites et Perspectives.....	131
<i>F. Conclusion</i>.....	134
<i>G. Bibliographie</i>	137
<i>H. Annexes</i>.....	162

Liste des abréviations

- AC : Acide canrénioïque
- ADP : Adénosine Diphosphate
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- APC : Adenomatous polyposis coli
- APD : Durée de Potentiel d'action
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATP : Adénosine Triphosphate
- AV : Auriculo-ventriculaire
- BMP : Bone Morphogenetic Protein
- CA : Cardiomyopathie arythmogène
- CAVD : Cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit
- C/EBP: CCAAT/enhancer-binding proteins
- CICR: Calcium induced calcium release
- CPVT: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
- CRISPR/Cas9: Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
- DMD : Dystrophie myotonique de Duchenne
- EHT: Engineered Heart-Tissue
- DAD: Delayed after depolarization
- DI: Disque intercalaire
- DSC: Desmocolline
- DSG: Desmogléine
- DSP: Desmoplakine
- EAD: Early after depolarization
- EB: Embryoid body ou Corps embryoïdes
- ECG : Electrocardiogramme
- ESC : Embryonic Stem Cells
- FGF : Fibroblasts Growth factor
- GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
- GSR : Glycine-sérine-arginine
- iPSC: Induced pluripotent stem cell

- iPSC-CM: Cardiomyocyte induced pluripotent stem cell
- KO : Knock out
- LEF : Lymphoid enhancer facteur
- MAPK: Mitogen-activated protein kinase
- MET : Microscopie électronique à transmission
- MgFr: Matrigel growth factor reduced
- MLC2v: Myosin light chain 2 ventricular
- MYH : Myosin heavy chain
- NCX: Sodium Calcium exchanger
- NS : Nœud sinusal
- PA : Potentiel d'action
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PCR : Polymerase chain reaction
- PFA : Progéniteurs fibro-adipeux
- Pi : Phosphate inositol
- PKA : Protéine kinase A
- PKC : Protéine kinase C
- Pkg : Plakoglobine
- PKP : Plakophiline
- PLB : Phospholamban
- PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated recepteur gamma
- RAA: Rénine-Angiotensine-Aldostérone
- ROS: Reactive Oxygen Species
- RS : Réticulum sarcoplasmique
- RT : Reverse Transcription
- RXR : Retinoid X receptors
- RYR : Récepteur à la ryanodine
- SERCA: Sarco-Endoplasmic Reticulum ATPase
- SMC : Cellules stromales mésenchymateuses cardiaques
- T007 : T0070907 / inhibiteur de PPAR γ
- T3 : Tri-iodothyronine
- TCF : Facteur de transcription des cellules T
- TGF : Transforming growth factor

- TMEM43 : Protéine transmembranaire 43
- Tn : Troponine
- TnC : Troponine C
- TnI : Troponine I
- TnT : Troponine T
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- Wnt : Wingless
- WWTR1: WW domain-containing transcription regulator protein 1
- YAP : Yes-associated protein

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Représentation schématique du cœur humain (A) et de la composition de l'enveloppe cardiaque (B)	16
Figure 2 : Représentation des mécanismes moléculaires de la contraction cardiaque décrivant le cycle d'association et de dissociation entre l'actine et la myosine	18
Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction (CEC)	20
Figure 4 : Représentation des différentes protéines composant le desmosome	21
Figure 5 : Schéma de la structure moléculaire de la desmoplakine	22
Figure 6 : Schéma de la structure moléculaire de la Plakoglobine et les 2 isoformes de la Plakophiline	24
Figure 7 : Schéma de la structure moléculaire de la Desmocolline et la Desmoglérine	25
Figure 8 : Représentation du système de conduction de l'activité électrique cardiaque	26
Figure 9 : Schéma représentatif d'un potentiel d'action et des courants ioniques associés ...	28
Figure 10 : Représentation schématique des différents types de potentiel d'action cardiaque et leur implication dans l'ECG	29
Figure 11 : Représentation des mécanismes pro-arythmiques déclenchant les EAD et DAD..	30
Figure 12 : Principe des arythmies de réentrées.....	31
Figure 13 : Caractéristique morphologique de la cardiomyopathie arythmogène	34
Figure 14 : Pourcentage des mutations impliquées dans la cardiomyopathie arythmogène ...	37
Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans la cardiomyopathie arythmogène	44
Figure 16 : Schéma récapitulatif des cellules sources des adipocytes dans la cardiomyopathie arythmogène	46
Figure 17 : Représentation récapitulative de l'utilisation de la technologie iPSC	50
Figure 18 : Représentation schématique de la progression séquentielle de la Cardiomyogenèse à travers les voies de signalisation ainsi que les facteurs de transcription et les marqueurs de surface cellulaire associés	51
Figure 19 : Représentation des différentes méthodes de différenciation cardiaque à partir d'iPSC	54
Figure 20 : Schéma des différentes techniques de maturation des hiPSC-CM	57
Figure 21 : Illustration du signal obtenu après analyse à partir des vidéos enregistrés	75
Figure 22 : Étude de l'ultrastructure des hiPSC-CM contrôles.....	79
Figure 23 : Étude de l'ultrastructure des hiPSC-CM mutés DSC2.....	81
Figure 24 : Effet de l'Acide canrénoïque sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM.....	118

Figure 25 : Effet de l'Acide canrénolique sur le Potentiel d'action des hiPSC-CM.....	119
Figure 26 : Effet de la spironolactone sur le Potentiel d'action des hiPSC-CM.....	120
Figure 27 : Effet de l'Acide canrénolique sur les courants potassiques.....	121
Figure 28 : Schéma bilan des principaux troubles entraînant une arythmie ventriculaire dans le cadre de la CA et les principaux traitements préventifs étudiés au cours de cette thèse....	136
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des cardiomyocytes issus d'iPSC et des cardiomyocytes humains adultes	55
Tableau 2 : Tableau récapitulatif de différentes études utilisant les hiPSC-CM dans le cadre de pathologie cardiaque	59
Tableau 3 : Tableau explicatif de la nomenclature et origine des lignées d'hiPSC	66
Tableau 4 : Résumé des gènes évalués dans cette étude. Gène cible, numéros d'accession, description du gène, amorce et tailles de produit	71

Résumé /abstract

La cardiomyopathie arythmogène est une maladie génétique rare. Elle est caractérisée par un dysfonctionnement cardiaque avec l'apparition d'arythmies ventriculaires, souvent responsables de morts subites par une fibrillation ventriculaire et un remplacement progressif des cardiomyocytes par du tissu fibro-adipeux. Le remodelage cardiaque atteint préférentiellement le ventricule droit, mais des formes bi-ventriculaire existent. Une mutation sur un gène desmosomal est retrouvée dans 50% des cas. Parmi les gènes impliqués, la plakoglobine, la desmocolline-2, la desmoglénine-2, la desmoplakine et la plakophiline-2 permettent l'ancrage et le maintien des cardiomyocytes entre eux. Une mutation sur l'un de ces gènes, entraîne la déstabilisation du desmosome et une fragilisation de la connexion entre les cardiomyocytes. Ceci conduit à un remodelage myocardique profond, maintenant bien défini, qui participe à l'initiation et au maintien des arythmies. Cependant, les mécanismes cellulaires restent insuffisamment compris.

Pour étudier cette pathologie, des cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC-CM) ont été utilisés comme modèle cellulaire intéressant afin de comprendre les mécanismes sous-jacents pour une multitude de pathologies cardiaques héréditaires, et d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques.

L'apparition d'arythmies dans la cardiomyopathie arythmogène est souvent considérée comme étant le résultat d'un remodelage morpho-structurel du myocarde. Cependant, les études sur le remodelage électrophysiologique font défaut. L'objectif principal de ma thèse était donc de valider notre modèle de cardiomyopathie arythmogène et d'étudier l'implication des altérations du couplage excitation-contraction dans le déclenchement des arythmies.

Notre modèle d'étude a été capable de reproduire un phénotype cohérent avec des défauts de contractilité dus à un remodelage électrophysiologique et calcique. Le test pharmacologique avec des anti-arythmiques, sotalol et flécaïnide, a permis de corriger les défauts de contraction et a amélioré notre compréhension de leur mécanisme d'action chez les patients atteints de la cardiomyopathie arythmogène. De plus, de nouvelles voies thérapeutiques testées sur les hiPSC-CM, ciblant la voie de signalisation PPAR γ et le système rénine-angiotensine-aldostérone ont montré des résultats prometteurs dans la prévention des arythmies et pourraient être pris en compte pour des études futures.

Mots clés : Cardiomyopathie ; Arythmie ; hiPSC-CM ; couplage excitation-contraction ; transdifférenciation ; PPAR γ

Arrhythmogenic cardiomyopathy is a rare genetic disorder characterized by cardiac dysfunction with the onset of ventricular arrhythmias, often responsible for sudden cardiac death and progressive replacement of cardiomyocytes by fibro-adipose tissue. Cardiac remodeling preferentially affects the right ventricle, but there bi-ventricular forms may be present. A mutation in a desmosomal gene is found in 50% of cases. Among the genes involved, plakoglobin, desmocollin-2, desmoglein-2, desmoplakin, and plakophilin-2 allow the anchoring and maintenance of cardiomyocytes between them. A mutation in one of these genes destabilizes the desmosome, weakening the connection between the cardiomyocytes. This alteration leads to a profound remodeling of the heart, now well defined, which participates in the initiation of arrhythmias. However, the role and impact of cellular mechanisms are poorly understood.

To study this pathology, cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM) were used as an exciting cell model to understand the underlying mechanisms for many hereditary cardiac pathologies and experiment with new therapeutic pathways.

The development of arrhythmias in arrhythmogenic cardiomyopathy is often considered the result of morpho-structural remodeling of the myocardium. However, studies on electrophysiological remodeling are lacking. Therefore, the main objective of my thesis was to validate our cellular model of arrhythmogenic cardiomyopathy and to study the involvement of alterations in the excitation-contraction coupling in the onset of arrhythmias.

Our study model reproduced a consistent phenotype with contractility defects due to electrophysiological and calcium remodeling. Testing anti-arrhythmic drugs, sotalol and flecainide, corrected contraction defects and improved our understanding of their mechanism of action in DSC2 patients. In addition, new therapeutic pathways tested on hiPSC-CMs, targeting the PPAR γ signaling pathway and the renin-angiotensin-aldosterone system, shown promising results in preventing arrhythmias and could be considered for future studies.

Keywords: Cardiomyopathy; Arrhythmia; hiPSC-CM; excitation-contraction coupling; transdifferentiation; PPAR γ

A. Revue de la littérature

I. Fonction et troubles du rythme cardiaque

1. Structure du cœur

a) Généralité

Le cœur est un organe cavitaire composé de deux cavités supérieures, les oreillettes, et deux cavités inférieures, les ventricules, comme illustré dans la figure 1A. Ces cavités sont séparées symétriquement par le septum qui délimite le cœur droit et le cœur gauche. Les oreillettes jouent un rôle de réception du sang et se contractent pour se vider dans les ventricules. Les ventricules éjectent le sang vers la circulation générale via l'aorte et le tronc pulmonaire. Les oreillettes communiquent avec les ventricules à l'aide de valves. Cette architecture structurale permet la circulation unidirectionnelle du sang dans le cœur. Les fonctions de remplissage et d'éjection du sang sont régies par les propriétés mécaniques et électriques cardiaques. La pompe cardiaque permet d'acheminer l'oxygène, les nutriments et d'autres éléments essentiels (hormone, enzymes) vers les organes par le sang *via* les vaisseaux sanguins. Ce système cardiovasculaire est divisé en deux circulations, une « petite » et une « grande ». La grande circulation, appelée également circulation systémique, alimente tous les organes périphériques. La petite circulation, ou circulation pulmonaire, permet l'oxygénation du sang au niveau des alvéoles pulmonaires. Le rythme cardiaque a la faculté de s'adapter en fonction des besoins de l'organisme pour assurer une perfusion efficace des tissus périphériques dans toutes les conditions physiologiques.

La figure 1B montre que la paroi cardiaque est constituée de trois tuniques (depuis l'intérieur vers l'extérieur) : l'endocarde, le myocarde et l'épicarde. L'épicarde, qui constitue la couche externe, est constitué de cellules épithéliales et de fibres élastiques. L'endocarde, qui tapisse les cavités internes, est composé de cellules épithéliales et séparé du myocarde par une couche sous-endocardique. Entre ces deux couches se trouve le myocarde, contenant notamment les cellules musculaires (les cardiomyocytes) responsables de la contraction des cavités cardiaques.

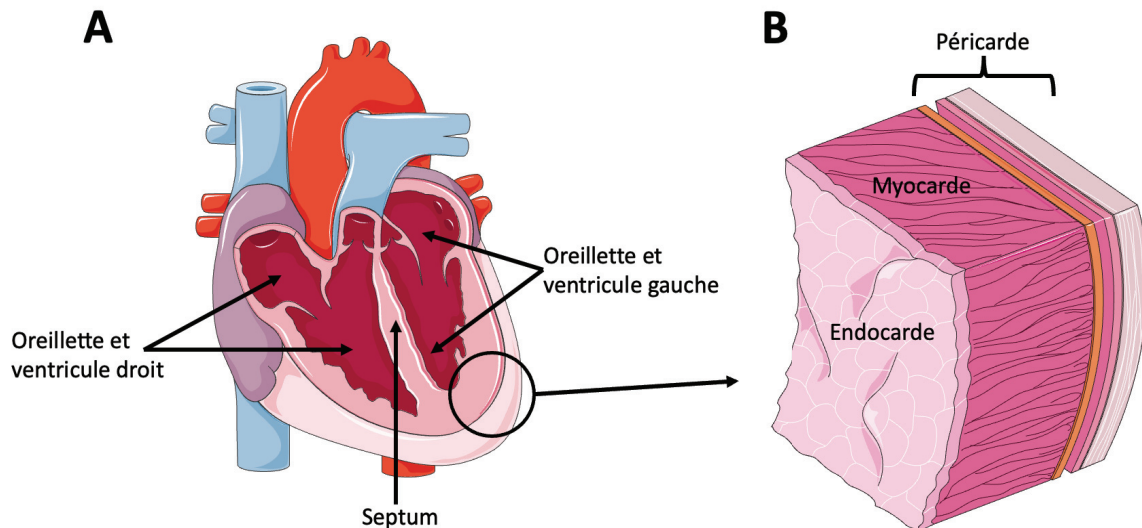


Figure 1 : Représentation schématique du cœur humain (A) et de la composition de l'enveloppe cardiaque (B)

Le cœur humain comporte 2 oreillettes et 2 ventricules séparés par le septum. L'enveloppe cardiaque est composée d'une couche interne, l'endocarde, suivi d'une couche épaisse de myocarde. La partie la plus externe est l'épicaarde composé de plusieurs sous-couches, le feuillet viscéral, la cavité péricardique, le feuillet pariétal et le péricarde fibreux (de la partie intérieure vers l'extérieur)

Servier image

b) Les cardiomyocytes

Le cœur est composé de cellules musculaires appelées cardiomyocytes. Les cardiomyocytes représentent seulement 30% des cellules présentes dans le cœur. Les 70% restants sont composés de fibroblastes et quelques cellules vasculaires et immunitaires. Les cardiomyocytes adultes sont des cellules différenciées et spécialisées ayant perdu leur capacité à se diviser. Les cardiomyocytes sont des cellules contractiles responsables de l'activité mécanique. Il existe une différence structurelle entre les cardiomyocytes atriaux et les cardiomyocytes ventriculaires. Ces derniers sont de plus grandes tailles avec une forme rectangulaire/cylindrique quand on les observe au microscope. Ils ont généralement une longueur d'environ 100 μm avec un diamètre de 15 μm , cependant les cardiomyocytes atriaux sont de plus petite taille avec une forme moins bien définie. Le cœur arbore également des cardiomyocytes particuliers dits cellules cardionectrices ou « pacemaker » responsables de la genèse de l'influx électrique. Ces cellules sont de petites tailles, faiblement contractiles et localisées dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et les fibres de Purkinje (Mangoni and Nargeot 2008).

D'un point vu structurel, les cardiomyocytes présentent un seul noyau avec un cytoplasme riche en protéines et ions. Ces cellules possèdent une membrane plasmique particulière appelée

sarcolemme. Le sarcolemme présente des invaginations formant des structures appelées tubules transverses ou, tubules T (Manfra, Frisk, and Louch 2017). Le rôle de ces invaginations est de propager les informations électriques rapidement vers le cœur de la cellule. Grâce à cette structuration, l'influx électrique arrive au plus près du réticulum sarcoplasmique (RS) où sont localisés les acteurs du couplage excitation/contraction. Les cardiomyocytes possèdent également une grande quantité de mitochondries afin de répondre aux besoins énergétiques élevés. En effet, les cardiomyocytes ont besoin d'une grande quantité d'énergie pour assurer une fonction contractile continue et performante.

2. Mécanismes de la contraction

Les cardiomyocytes sont donc des cellules contractiles. Pour assurer cette fonction contractile, la cellule possède des structures protéiques filamenteuses particulières appelées myofibrilles. Ces filaments sont organisés et structurés en unité contractile appelée sarcomère et composée de plusieurs protéines essentielles.

Les deux protéines les plus importantes dans la composition du sarcomère sont les filaments fins d'actines et les filaments épais de myosine.

L'actine est composée elle-même de 3 protéines majeures : - l'actine, la tropomyosine et le complexe de troponine. L'actine est une protéine globulaire possédant un site d'interaction avec la myosine, ce qui est crucial pour permettre la contraction cellulaire. La tropomyosine agit lorsque le muscle est au repos en se liant à la myosine, stabilisant ainsi l'actine. Enfin le complexe de troponine est composé 3 sous-unités clés. Parmi ces sous-unités, la troponine C (TnC) possède un site de fixation au calcium, la troponine I inhibitrice (TnI) va inhiber l'interaction entre l'actine et la myosine, et enfin la troponine T (TnT) peut se lier à la tropomyosine.

Les filaments épais sont composés de myosine. La myosine est un hétéramère composé de 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères. Il existe deux isoformes : - l'isoforme α est principalement retrouvée au niveau des oreillettes, alors que l'isoforme β est spécifique des ventricules. La tête globulaire de la myosine possède un site de fixation pour l'actine et pour l'ATP.

Lors de la contraction cardiaque, le calcium et l'ATP (Adénosine-Triphosphate) sont deux messagers secondaires. Au repos, le niveau calcique intracellulaire est basal (au plus bas niveau) et la TnI interagit alors avec la tropomyosine et masque alors le site d'interaction entre l'actine et la myosine. Lors d'une augmentation de calcium, celui-ci va se fixer à la TnC,

entraînant alors un déplacement de la TnI et n'interagissant plus avec la tropomyosine. Ceci a pour conséquence de démasquer les sites d'interactions entre l'actine et la myosine. À la suite d'une libération de calcium intracellulaire, la myosine peut donc se lier à l'actine.

Dans les premières étapes de la contraction, suite de l'hydrolyse de l'ATP, la myosine est liée à l'adénosine diphosphate (ADP) avec un phosphate inorganique (Pi). La libération de l'ADP et du Pi fait pivoter les têtes de myosine entraînant un glissement des filaments d'actines. Ce phénomène induit un raccourcissement du sarcomère et donc la contraction. Le cardiomyocyte revient dans un état relâché à la suite de la fixation de l'ATP sur les têtes de myosine, provoquant la séparation avec l'actine. L'hydrolyse de l'ATP, *via* des ATPases des têtes de myosine, permet de boucler le cycle de contraction et de revenir à un état basal. Ces différentes étapes de la contraction cellulaire sont résumées dans la figure 2. La contraction des cardiomyocytes consomme beaucoup d'énergie d'où la nécessité d'avoir une grande quantité de mitochondries.

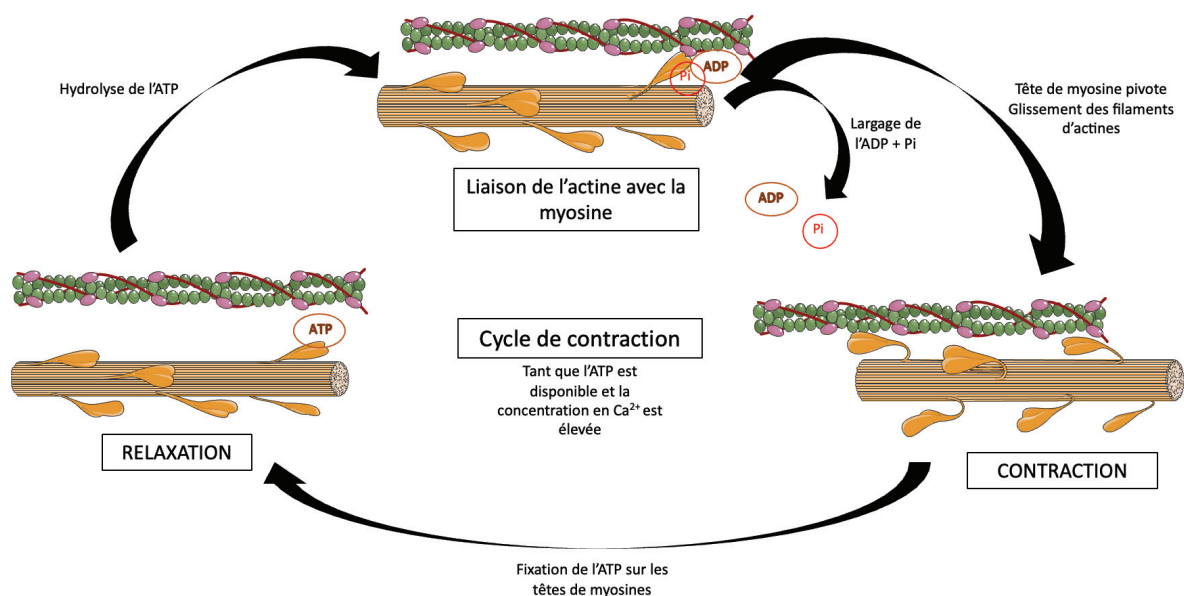


Figure 2 : Représentation des mécanismes moléculaires de la contraction cardiaque décrivant le cycle d'association et de dissociation entre l'actine et la myosine

À la suite d'une augmentation de calcium intracellulaire, la troponine change de conformation et libère le site d'interaction entre l'actine et les têtes de myosine. L'hydrolyse de l'ATP permet la fixation de l'ADP et le Pi sur les têtes de myosine et forme des ponts d'unions entre l'actine et la myosine. Le relargage de l'ADP + Pi fait pivoter les têtes de myosine et entraîne le glissement des filaments d'actines vers le centre de la cellule. La fixation de l'ATP sur les têtes de myosine provoque la rupture des ponts d'unions.

Servier image

3. Couplage excitation-contraction

La contraction des cardiomyocytes est déclenchée par l'arrivée d'une activité électrique dépolarisante. Différents acteurs interviennent dans ce mécanisme. Ils sont représentés dans la figure 3. La dépolarisation transitoire rapide de la membrane plasmique entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. Une entrée massive de calcium dans le cytoplasme déclenche à son tour l'ouverture des récepteurs à la Ryanodine de type 2 (RyR2) (Donald M. Bers 2002). Le RyR2 est un canal ionique, localisé à la surface du RS, permettant le passage d'une grande quantité de calcium du RS vers le cytoplasme de la cellule. Ce phénomène est appelé « *calcium-induced calcium release* » (CICR) (Fabiato 1983). Le calcium peut alors se lier à la TnC permettant la contraction du cardiomyocyte. Enfin, lors de la relaxation cellulaire, le calcium se détache de la TnC et est recapturé en grande partie à l'intérieur du RS via la pompe SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum ATPase*, en anglais) et une autre partie est extrudée de la cellule via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*Sodium Calcium exchanger* NCX en anglais) (Pfeiffer et al. 2014). Le phospholamban (PLB) est une protéine transmembranaire du RS et est également un acteur de la recapture du calcium, car il module l'activité de la SERCA. En condition basale, le PLB inhibe la recapture du calcium par la SERCA. La phosphorylation du PLB lève cette inhibition. Ceci augmente l'affinité du calcium avec la SERCA et accélère la recapture de cet ion (Akin et al. 2013). L'échangeur NCX, quant à lui, fait sortir de la cellule un ion calcium en échange d'une entrée de trois ions sodiques, rendant cet échange électrogénique et potentiellement pro-arythmogène (Nagy et al. 2004).

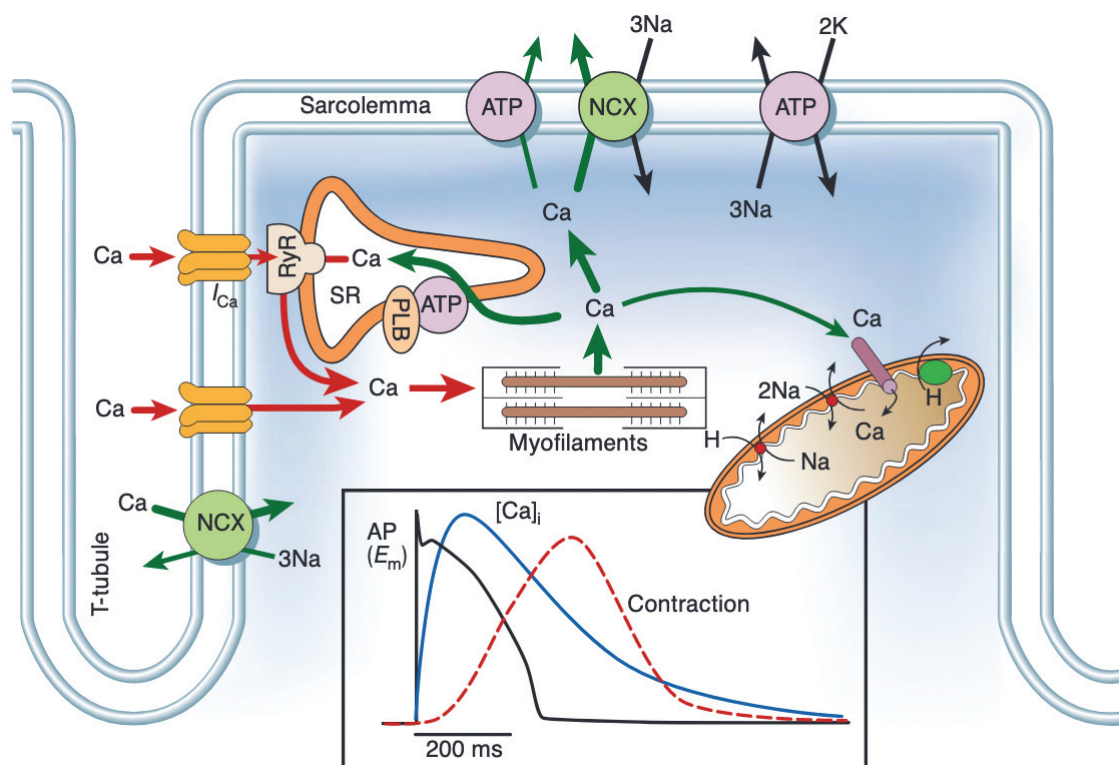


Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction (CEC)

L'activation des canaux $\text{Na}_v1.5$ permet l'ouverture des canaux $\text{Ca}_v1.2$ induisant une entrée d'ions Ca^{2+} . L'activation du RyR2 par Ca^{2+} conduit à une libération massive de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique (RS) conduisant à la fixation de Ca^{2+} sur les myofilaments entraînant une contraction musculaire. Le retour à une concentration initiale de Ca^{2+} intracellulaire est obtenu par la recapture du Ca^{2+} dans le RS par la SERCA et en extrudant le Ca^{2+} hors de la cellule par le NCX, entraînant une relaxation musculaire.

Bers 2002

4. Les disques intercalaires

Le cœur est un organe qui subit de fortes contraintes mécaniques. De plus, les cardiomyocytes doivent propager l'influx électrique rapidement afin d'avoir une contraction cardiaque coordonnée. Pour remplir ce rôle, les disques intercalaires (DI) vont permettre de maintenir l'intégrité mécanique et structurale du cœur, tout en propageant rapidement l'activité électrique de cellules à cellules. Les DI sont composés du desmosome et des jonctions communicantes ou jonctions gap.

a) Le desmosome

Les desmosomes sont des jonctions intercellulaires qui assurent une forte adhésion entre les cardiomyocytes. On retrouve les desmosomes dans des tissus tels que l'épiderme et le myocarde où ils subissent continuellement des forces mécaniques. De plus, ils se lient au

cytosquelette formant des liaisons fortes avec les filaments intermédiaires et conférant ainsi une résistance mécanique aux tissus. Parmi les protéines desmosomales décrites dans la figure 4, on retrouve la desmoplakine (DSP), les protéines armadillos composées de la plakoglobine (Pkg) et de la plakophiline (PKP), ainsi que les cadhérines telles que la desmocolline (DSC) et la desmogléine (DSG).

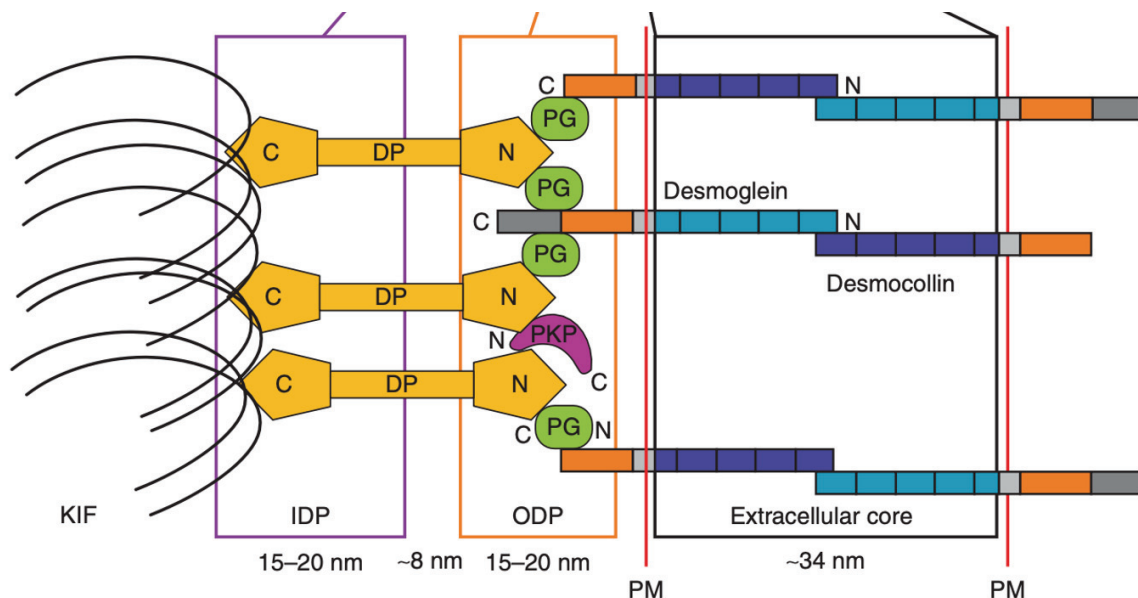


Figure 4 : Représentation des différentes protéines composant le desmosome

Le desmosome est composé de plusieurs protéines. De droite à gauche, le desmosome est composé de la DSC2 et de la DSG2 permettant la liaison avec le desmosome d'une cellule voisine et liant les protéines desmosomales intracellulaires, dont la Pkg et la PKP2, se liant toutes les deux à la DSP. Cette dernière permet la liaison aux filaments du cytosquelette.

KIF : *Keratin Intermediate Filaments* (Filaments intermédiaires de kératine) ; IDP : *Inner Dense Plaque* (Plaque dense interne) ; DP : Desmoplakine ; PG : Plakoglobine ; PKP : Plakophiline ; ODP : *Outer Dense Plaque* (Plaque dense externe) ; PM : *Plasma membrane* (membrane plasmique)

Delva et al. 2009

Desmoplakine

Tout d'abord, la desmoplakine est la plus abondante dans le desmosome. Elle interagit avec les filaments intermédiaires de desmine dans les cardiomyocytes. La structure de la DSP est composée de trois domaines, une tête globulaire en partie N-terminale, et une partie centrale en forme de tige enroulée reliant la queue C-terminale (Jefferson et al. 2007). La structure de cette protéine est illustrée dans la figure 5. La tête globulaire fournit des sites de liaisons pour les protéines armadillos (Pkg et PKP) (Choi et al. 2002). La région C-terminale contient trois domaines répétés de plakine homologue que l'on nomme A, B et C. Cette partie est composée également d'un domaine riche en glycine-sérine-arginine (GSR) permettant de réguler la

capacité de la desmoplakine à interagir avec les filaments intermédiaires (Stappenbeck et al. 1994). Comme montré dans la figure 5, il existe deux isoformes de DSP : la DSP I de 322 kDa et la DSP II de 259 kDa, sont générées par épissage alternatif et ne diffèrent que par la longueur du domaine central. La DSP I est la forme prédominante dans les myocytes cardiaques (Uzumcu 2005).

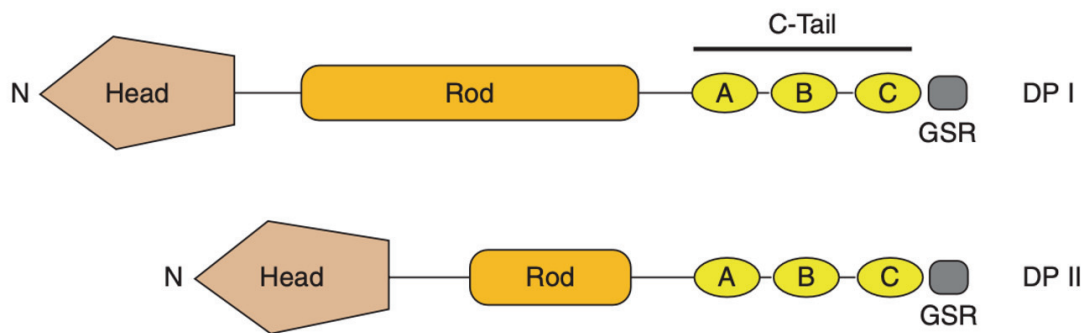


Figure 5 : Schéma de la structure moléculaire de la desmoplakine

La DSP est composée d'une tête globulaire (Head) à l'extrémité N-terminal qui médie les interactions protéiques. La partie centrale (Rod) diffère par la longueur de cette partie créant 2 isoformes de la DSP. La partie C-terminal contient trois domaines répétés de plakine (A, B, C), ainsi qu'un domaine riche en glycine-sérine-arginine (GSR) régulant la liaison de la DSP aux filaments intermédiaires Delva et al. 2009

Les protéines armadillo

Les protéines armadillo ont premièrement été découvertes chez la drosophile pour réguler la polarité segmentaire (Peifer et al. 1992). Les membres de cette famille sont composés de la tête N-terminale, d'une partie centrale et d'une queue C-terminale. La caractéristique principale de ces protéines se trouve dans le domaine central. Ce domaine contient un nombre variable de répétitions de 42 acides aminés (appelés répétitions *arm*). Parmi ces protéines, on retrouve la Pkg, la β -caténine et les PKP (Hatzfeld 2007). Le rôle de ces protéines dans les desmosomes est de se lier avec la desmoplakine. Cela confère donc aux protéines armadillo un rôle de relai entre les cadhérines et la desmoplakine.

Plakoglobine

La Pkg est la mieux caractérisée des protéines armadillo. D'un point de vue structurel, illustré dans la figure 6, elle contient 12 répétitions *arm*. Plusieurs études de mutagenèse par délétion suggèrent que la clé de liaison aux cadhérines se trouve dans la partie C-terminale de la protéine (Witcher et al. 1996). Cette protéine semble majoritairement localisée dans les

desmosomes, probablement parce que son affinité pour les cadhérines desmosomales est plus forte que celle des E-cadhérines présente aux jonctions adhérentes (Chitaev et al. 1996). La Pkg présente 85% d'homologie avec la β -caténine (Peifer et al. 1992). En plus de jouer un rôle structural dans les jonctions cellule-cellule, la plakoglobine participe à la transduction du signal intracellulaire (Peifer, Berg, and Reynolds 1994). En effet, la β -caténine et la Pkg fonctionnent comme un régulateur du facteur de transcription des cellules T (TCF) et donc module la voie de signalisation Wnt. Deux études sur des kératinocytes ont montré qu'une surexpression de la Pkg diminuait la prolifération de ces cellules alors qu'une surexpression de la β -caténine augmentaient la prolifération *via* la voie de signalisation Wnt. Ces résultats suggèrent qu'il existe un équilibre entre ces deux protéines (Charpentier et al. 2000; Gat et al. 1998).

Plakophiline-2

Il existe 3 formes de PKP (1-3) présentant 55% d'homologies dans la partie *arm* avec les autres protéines armadillo. Ces isoformes se trouvent principalement dans les desmosomes (Hatzfeld 2007). Parmi ces protéines, la forme la plus proéminente dans le cœur est la PKP2 (Grossmann et al. 2004). La partie centrale de la PKP2 contient 9 répétitions *arm* avec un ajout d'acides aminés donnant une forme courbée à la protéine, comme il est possible d'observer dans la figure 6 (Mertens, Kuhn, and Franke 1996). Il existe deux isoformes de la PKP2, une variante « a », plus courte, et une forme « b » plus longue (44 acides aminés supplémentaires) générée par épissage alternatif, figure 6. Comme pour les autres protéines de cette famille, la PKP sert avant tout de protéine d'échafaudage où son rôle est fortement lié à la formation du complexe desmosomal, notamment en liant la Pkg et la desmoplakine (X. Chen et al. 2002). De récentes études, notamment sur la PKP2, montrent que cette protéine joue un rôle important dans le transport de la desmoplakine vers la membrane lors de l'assemblage du desmosome. La PKP2 régulerait l'association de la desmoplakine avec les filaments intermédiaires par le biais de son rôle d'échafaudage avec la protéine kinase C (PKC) (Green et al. 2010; Godsel et al. 2005).

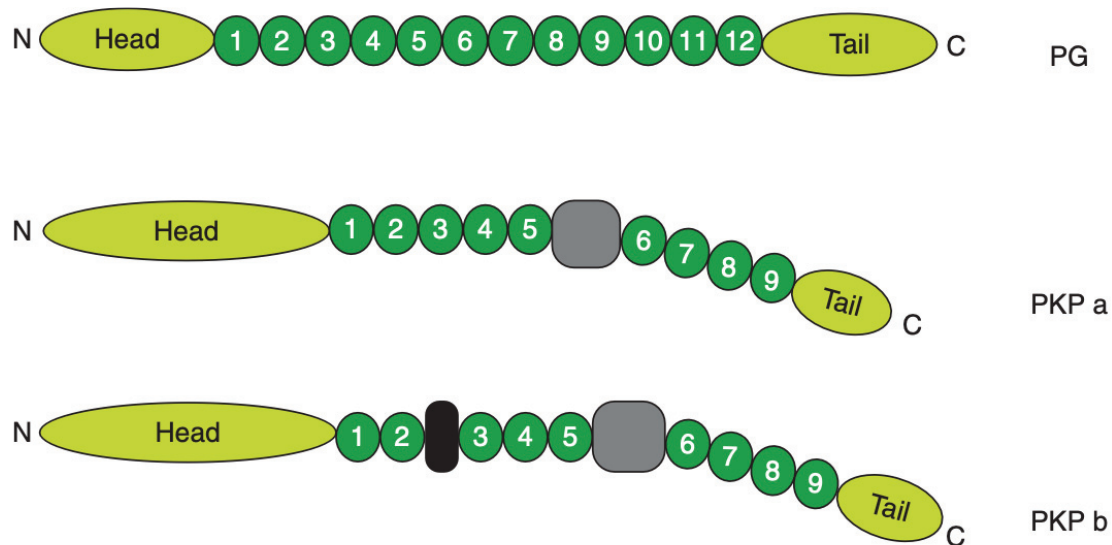


Figure 6 : Schéma de la structure moléculaire de la Plakoglobine et les 2 isoformes de la Plakophiline

La Pkg et la PKP font partie de la famille des protéines armadillo. La plakoglobine (PG) contient 12 répétitions arms qui sont flanquées d'une tête N-terminal et une queue C-terminal. Les PKP contiennent des répétitions à 9 bras et comprennent un insert entre les répétitions 5 et 6 qui introduit une courbure dans la structure globale. Il existe 2 isoformes de la PKP, une forme courte a et longue b.

Delva et al. 2009

Les Cadhérines desmosomales

Les cadhérines desmosomales sont composées des DSC et des DSG, figure 7. Elles constituent les protéines transmembranaires des desmosomes. Chez l'homme on retrouve 7 isoformes : 3 pour les DSC et 4 pour les DSG (Green and Simpson 2007). La figure 7 démontre que ces protéines comportent toutes quatre domaines extracellulaires homologues aux cadhérines, un domaine transmembranaire et un domaine d'ancrage intracellulaire. Les domaines extracellulaires comptent environ 110 acides aminés et sont séparés par des motifs de liaison au calcium. Le calcium extracellulaire est important pour le maintien de l'intégrité des cadhérines (Pokutta and Weis 2007). La DSG et la DSC contiennent un site intracellulaire spécial pour se lier avec la Pkg (Mathur, Goodwin, and Cowin 1994). Les DSG comprennent une extension C-terminale qui leur sont propre et diffèrent des DSC par ce domaine. Notamment on trouve un domaine de liaison intracellulaire riche en proline et un domaine terminal riche en glycine (Garrod and Chidgey 2008). Les fonctions de cette extension restent encore à définir. Généralement les cadhérines présentent une adhésion protéique dépendante du calcium et forment des interactions homophiles. Ceci soutient l'adhésion cellulaire et la structuration des tissus. Ces cadhérines desmosomales jouent donc un rôle central dans la

structure cardiaque. Au niveau du cœur, les isoformes de la DSC2 et de la DSG2 sont retrouvées (Garrod and Chidgey 2008).

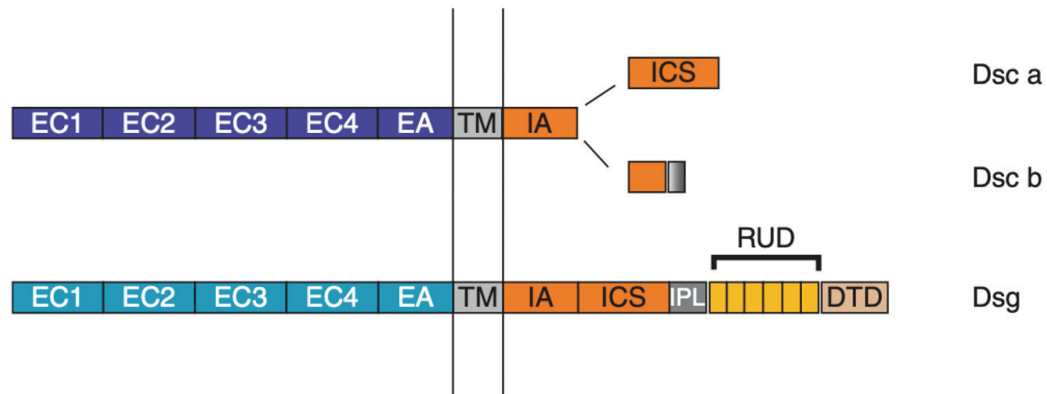


Figure 7 : Schéma de la structure moléculaire de la Desmocolline et la Desmoglérine

La DSG et la DSC contiennent quatre domaines extracellulaires, une ancre extracellulaire, un domaine transmembranaire et une ancre intracellulaire, qui est suivie d'une partie cytoplasmique différente entre les 2 protéines. La DSG et l'isoforme « a » de la DSC contiennent une séquence intracellulaire de type cadhérine permettant la liaison à la Pkg.

Delva et al. 2009

b) Les jonctions gap

Les jonctions gap sont le deuxième élément qui composent les DI. Ces jonctions sont impliquées dans un certain nombre de fonctions biologiques, notamment dans le passage direct du courant électrique entre les cardiomyocytes (Saffitz et al. 1995). D'un point de vue organisationnel, ces jonctions sont composées de 2 connexons à travers l'espace extracellulaire et forment, une fois assemblées, un pore perméable. Chaque connexon résulte de l'oligomérisation d'une protéine membranaire appelée connexine. Au niveau cardiaque, la connexine 43 est la plus abondante et est impliquée dans la propagation de l'influx électrique. L'ancrage et le maintien des connexines à la membrane sont hautement assurés par les desmosomes. En effet, de récentes études ont montré que notamment la PKP2 assurait la stabilité de la connexine 43 au niveau membranaire (Sato et al. 2009; Pieperhoff, Schumacher, and Franke 2008; M. W. M. Li et al. 2009).

5. Activité électrique cardiaque

a) Genèse et propagation électrique

L'activité électrique cardiaque naît au niveau du nœud sinusal (NS), localisé dans la paroi supérieure de l'oreillette droite. Le NS constitue le pacemaker dominant du cœur et est considéré comme le chef d'orchestre de l'impulsion électrique. L'excitation électrique se propage dans les oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire (AV), situé au plus près des ventricles, dans la cloison inter-auriculaire droite. Le nœud AV possède également un rôle de pacemaker, à une fréquence spontanée plus faible cependant que le NS. Dans le cas où le NS est déficient, celui-ci peut prendre le relai. L'impulsion électrique se propage ensuite aux ventricles *via* le système conducteur, composé du faisceau de His et les fibres de Purkinje. Le faisceau de His, situé dans la cloison interventriculaire, permet de rallier le nœud AV et les ventricles. Ce faisceau de His se ramifie en deux branches formant les fibres de Purkinje. Ces fibres rentrent en profondeur dans les ventricules et ainsi contribuent au déclenchement simultané des ventricules (Nerbonne and Kass 2005). La genèse et la propagation de l'influx électrique sont illustrées dans la figure 8.

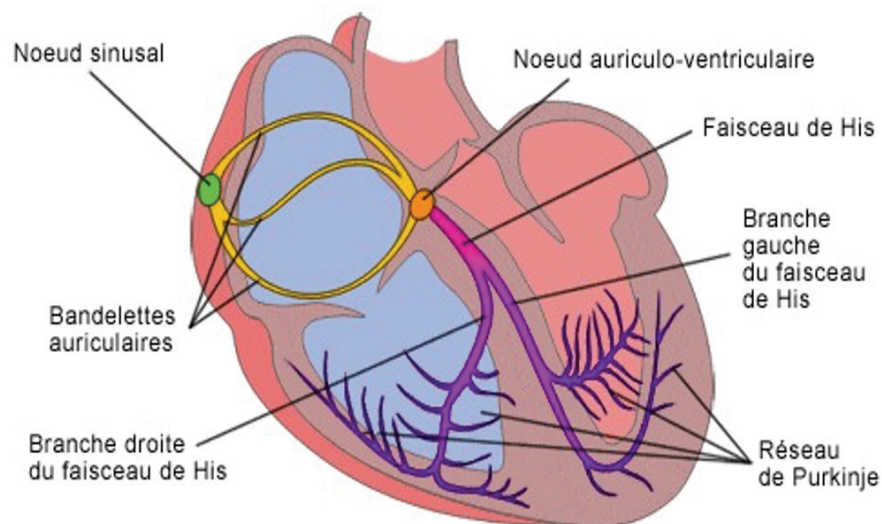


Figure 8 : Représentation du système de conduction de l'activité électrique cardiaque

L'activité électrique cardiaque naît au niveau du nœud sinusal, qui constitue le pacemaker du cœur, et se propage dans les oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire. L'activité électrique descend dans le septum jusqu'à l'apex à l'aide du faisceau de His et se propage de bas en haut dans les ventricules à partir du réseau de Purkinje

Inhalotherapie.com

b) Le potentiel d'action

L'activité électrique au sein du cœur est caractérisée par la génération et la propagation de potentiels d'actions (PA). Le PA correspond à une dépolarisation transitoire du potentiel de membrane due à l'activation et l'inactivation séquentielle de canaux ioniques dépendants du potentiel, assurant un flux d'ions entre les milieux intracellulaire et extracellulaire en fonction du gradient électrochimique. Il se décompose en 5 phases, illustré dans la figure 9.

La phase 0 de dépolarisation est très rapide, quelques millisecondes, et dépolarise la cellule entre -80 mV à +30 mV. Cette phase est due à l'activation d'un courant sodique entrant voltage-dépendant.

La phase 1 de repolarisation précoce est plus importante dans les oreillettes qui possèdent un PA plus court que les PA ventriculaires. Une légère et transitoire repolarisation membranaire survient lors de cette phase. Les canaux potassiques $K_{V4.2}$ et $K_{V4.3}$ supportant le courant potassique transitoire sortant I_{to} (efflux de potassium), sont responsables de cette phase 1 (Nerbonne and Kass 2005).

La seconde phase se caractérise par un plateau où la polarité membranaire est stabilisée aux alentours de 0 mV. Cette phase met en jeu des canaux calciques voltages-dépendants et permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. Le second courant impliqué dans cette phase est un courant potassique retardé sortant I_{Ks} permettant de faire sortir des ions potassiums. Cette phase de plateau se maintient aussi grâce à l'action de l'échangeur NCX dont le sens dépend du gradient de concentration des deux ions. C'est l'équilibre entre la sortie et l'entrée des charges positives qui permet de maintenir la polarité membranaire (D. M. Bers and Perez-Reyes 1999).

La phase 3 est la phase dite de repolarisation finale. Elle permet le retour au potentiel de repos à -80 mV. Cette phase est due à la sortie de charges positives, concomitantes à l'arrêt d'entrée de charges positives grâce à une inactivation plus rapide des canaux calciques voltages dépendants. Cette phase fait intervenir un autre courant potassique I_{Kr} , et lorsque la cellule atteint -50 mV, un autre courant potassique s'active : le courant I_{K1} . Ce dernier présente une rectification dans le sens entrant et permet le retour et le maintien de la polarité membranaire à -80 mV (Schram et al. 2002). Ce retour à ce potentiel correspond à la phase 4 et est la phase dite de repos.

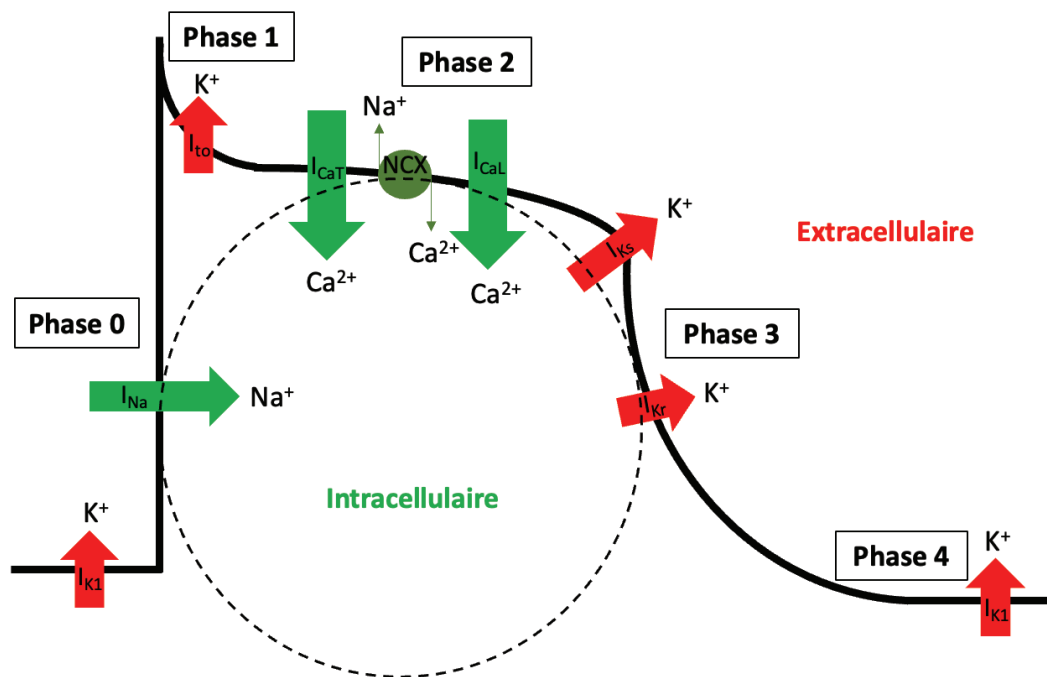


Figure 9 : Schéma représentatif d'un potentiel d'action et des courants ioniques associés

La phase 0 du potentiel d'action représente la dépolarisation et est régie par une entrée d'ions sodique due au courant I_{Na} . La phase 1 représente la repolarisation précoce par une sortie d'ions potassiques par le courant I_{to} . Cette phase est suivie du plateau dû à une entrée et augmentation massive intracellulaire de calcium. La phase 3 représente la repolarisation due à une sortie d'ions potassiques par les courants I_{Ks} et I_{Kr} . Enfin la phase 4 représente la phase de repos et est régie par le courant I_{K1} .

Tous les PA cardiaques comportent ces 5 phases. Néanmoins, on distingue différents types de PA selon l'origine cellulaire, comme il est possible de l'observer dans la figure 10. En effet, il existe une différence entre les PA auriculaires et ventriculaires avec une durée de (APD) beaucoup plus courte au niveau des oreillettes. De plus, le PA arbore une morphologie légèrement différente entre les couches endocardiques et épocardiques ; ceci afin de permettre une repolarisation homogène du tissu. Enfin, les zones *pacemaker* du cœur présentent une dépolarisation diastolique lente due à l'expression du canal HCN responsable du courant I_f ou courant de pacemaker. Ce canal est perméable pour les ions sodiums (Na^+) et potassiques (K^+) et est responsable d'un courant entrant dans la cellule. Il a été étudié pour la première fois en 1979 par Dario DiFrancesco et identifié comme un régulateur majeur de la fréquence cardiaque, notamment en réponse aux catécholamines (DiFrancesco 1993; Brown, DiFrancesco, and Noble 1979).

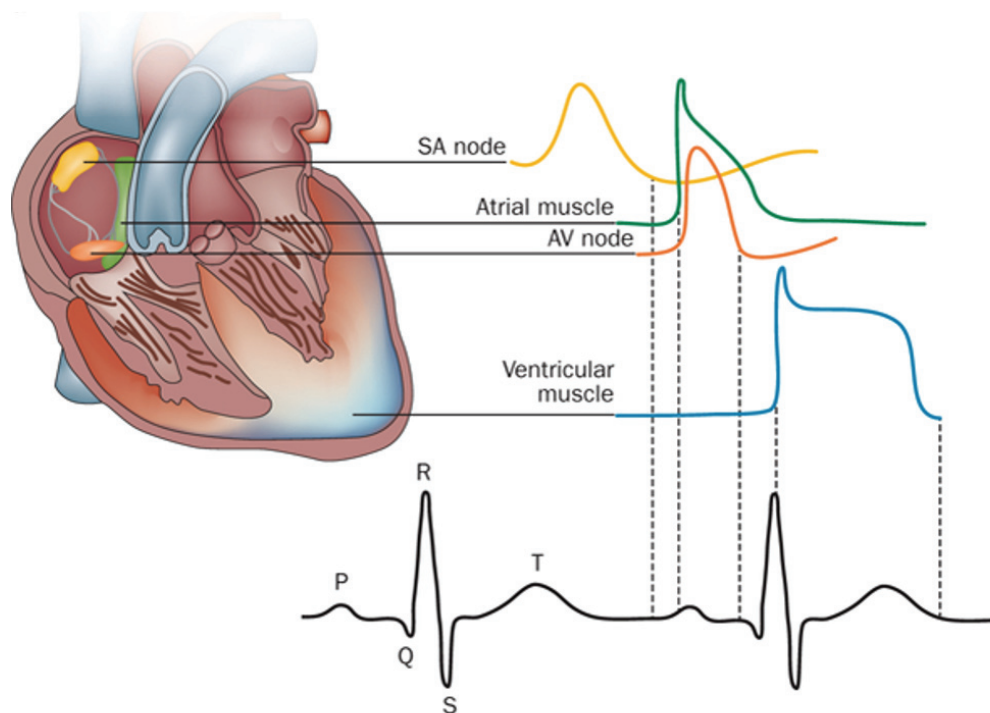


Figure 10 : Représentation schématique des différents types de potentiel d'action cardiaque et leur implication dans l'ECG

Les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires ne présentent pas de dépolarisation diastolique lente comparé aux cellules du nœud sinusal et du nœud atrio-ventriculaire. Les cardiomyocytes de ces deux dernières zones ont un profil qui leur est propre leur permettant d'assurer leur fonction de pacemaker. Le PA atrial représente l'onde P jusqu'au complexe QRS, alors que le PA des ventricules représente la durée du QT de l'ECG

Giudicessi et al. 2012

6. Troubles du rythme cardiaque

Les troubles du rythme, nommées arythmies, correspondent à des perturbations dans la genèse et/ou la propagation de l'influx électrique. Ceci a pour conséquence d'altérer l'enchaînement spatial et/ou temporel de l'excitation des oreillettes et des ventricules ou de leur couplage. Ces altérations peuvent affecter la fréquence, la régularité ou le site de formation de l'impulsion. D'après le triangle de Coumel, trois composantes sont nécessaires pour générer une arythmie : un facteur déclencheur, un substrat arythmogénique et un facteur modulateur (Farré and Wellens 2004).

Un automatisme anormal ou une activité déclenchée spontanément sont considérés comme des facteurs pro-arythmogéniques. Ceci se produit dans des cardiomyocytes ventriculaires où le potentiel de repos est « pathologiquement » dépolarisé, ou à la suite de la prise de médicaments comme des digitaliques. Une diminution du potentiel de membrane conduit à une dépolarisation diastolique spontanée générant un PA pendant la diastole.

Une autre cause de facteurs déclencheurs est un déséquilibre entre les courants sortants et entrants modifiant l'excitabilité membranaire. Ces courants entrants ectopiques sont à l'origine de post-dépolarisations précoces ou tardives (*Early/Delayed-after depolarization EAD, DAD* en anglais). Les EAD surviennent lorsque le PA est anormalement prolongé et correspondent à une nouvelle phase de dépolarisation de la membrane au lieu de la repolarisation attendue. L'allongement du PA permet de dépasser la période réfractaire de canaux ioniques, les rendant de nouveaux disponibles, tels que les canaux calciques de type lents, comme illustré dans la figure 11. Cet allongement peut être la conséquence d'une hypokaliémie ou l'utilisation de certains médicaments tels que la quinidine, le vérapamil ou le diltiazem (Weiss, Qu, and Shivkumar 2017). Les DADs se produisent après la repolarisation de la membrane. Ils surviennent, par exemple, en cas d'intoxication digitalique ou d'une élévation du niveau de calcium intracellulaire. Une surcharge calcique intracellulaire fait sortir des ions calcium par l'échangeur NCX. Cependant ceci fait entrer des ions sodiums dans la cellule. Si l'entrée de sodium est suffisante pour créer une post-dépolarisation atteignant le potentiel seuil pour l'activation des canaux sodiques $Na_v1.5$, ceci déclenche un nouveau PA (Ter Keurs and Boyden 2007). Ce phénomène est illustré dans la figure 11.

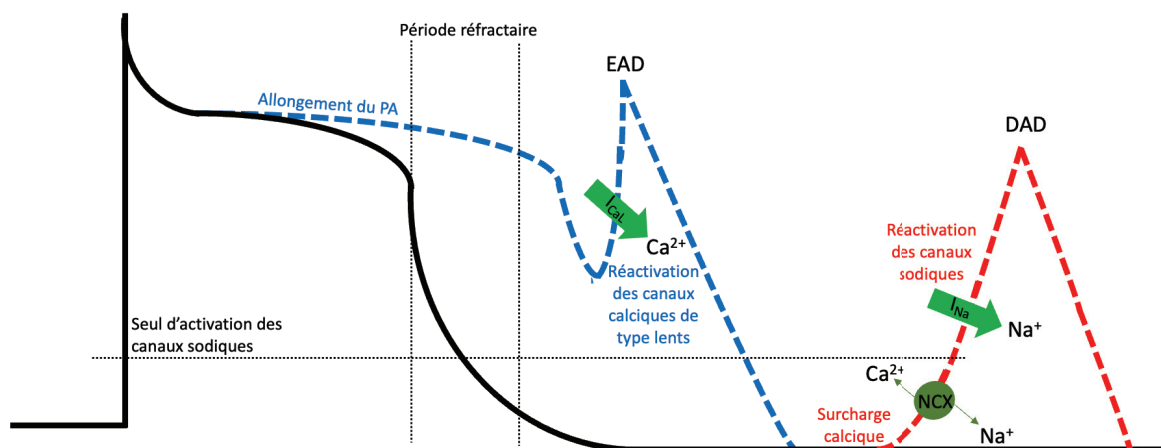


Figure 11 : Représentation des mécanismes pro-arythmiques déclenchant les EAD et DAD

Durant la systole, une élévation du potentiel d'action induit un dépassement de la période réfractaire des canaux calciques pouvant être réactivée et déclencher des dépolarisations précoces arythmiques. Durant la diastole, une surcharge calcique intracellulaire active le NCX faisant extruder le calcium, mais induit une entrée de sodium. Cette entrée de sodium induit une dépolarisation de la cellule, si cette dépolarisation dépasse le seuil d'activation des canaux sodiques, cela crée une dépolarisation tardive arythmique.

L'automatisme anormal et les EAD/DAD sont des facteurs déclencheurs d'arythmies, notamment des extrasystoles. Les extrasystoles correspondent à une impulsion électrique issue

d'un foyer ectopique. Elles peuvent être isolées ou dégénérer en tachycardie ou fibrillation en présence d'un substrat arythmogène.

Une lésion anatomique peut générer un phénomène de fibrose, créant un substrat arythmogène. Ceci crée un bloc de conduction et est l'une des causes du phénomène de réentrée. La réentrée est caractérisée par le fait qu'une impulsion électrique ne s'éteint pas après une première activation, mais persiste et réactive le tissu cardiaque précédemment excité, illustré dans la figure 12. Deux phénomènes sont nécessaires à la réentrée : un bloc unidirectionnel de conduction et une zone de conduction lente. Le bloc unidirectionnel correspond à un bloc de conduction transitoire dans une direction, le long d'un groupe de fibres myocardiques. La présence d'un bloc entraîne une conduction électrique asymétrique en forme de boucle à travers laquelle la même activité électrique peut à nouveau se propager et ré-exciter les zones précédemment traversées. Une conduction lente, ou une boucle d'activation suffisamment étendue, est une condition supplémentaire pour l'apparition d'une réentrée. L'influx doit être suffisamment retardé pour permettre à des régions situées en aval de l'activation de récupérer leur excitabilité. Les périodes réfractaires courtes favorisent ce phénomène et permettent des réentrées plus rapides (Kléber and Rudy 2004). La réentrée établit un environnement propice au déclenchement d'une fibrillation ventriculaire en combinaison d'une extrasystole. Les fibrillations correspondent à des spasmes de haute fréquence et non coordonnées du myocarde. Ce phénomène est très dangereux à cause de l'insuffisance de l'apport de sang au reste de l'organisme.

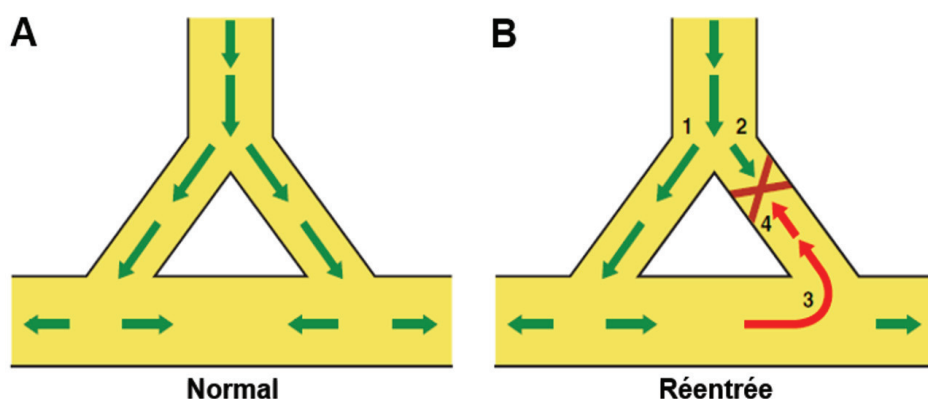


Figure 12 : Principe des arythmies de réentrées

A gauche (A) dans le tissu sain, le signal électrique parcourt chaque branche à vitesse égale. Si les deux branches sont connectées, les signaux rencontreront des tissus réfractaires et ne progresseront plus. Cependant en condition pathologique, à droite (B), une des branches présente un bloc de conduction (croix rouge), le signal électrique descendra dans une seule branche et pourra exciter cette branche dans un moment où elle n'est pas réfractaire. Ceci créera une ré-excitation du tissu.

Schmitt et al. 2014

Enfin, le système nerveux autonome possède un rôle important dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire, car il régule la fréquence cardiaque (effet chronotrope), la force de contraction (effet inotrope), la vitesse de conduction (effet dromotrope), l'excitabilité (effet bathmotrope) et la relaxation (effet lusitrope) du cœur. Ce contrôle est effectué par l'innervation des systèmes sympathique et parasympathique (Vaseghi and Shivkumar 2008). Cependant une innervation aberrante peut être une cause majeure dans le déclenchement des arythmies. Ceci correspond au facteur modulateur d'arythmies. En effet, la stimulation sympathique du cœur, via les récepteurs β -adrénergiques (majoritairement de type 1), est un mécanisme de contrôle extrinsèque important ayant un effet excitateur sur la fonction cardiaque *via* son médiateur la norépinephrine. L'activation de ces récepteurs β_1 entraîne la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), activant directement le courant i_f (canal pacemaker), conduisant à une augmentation du rythme cardiaque. De plus, l'AMPC active la protéine kinase A (PKA), qui permet elle-même la phosphorylation du canal Ca_v de type L. Cela augmente la force et la fréquence de la contraction cardiaque, ainsi que la phosphorylation du PLB, augmentant également la relaxation cardiaque. Par conséquent, une perturbation cardiaque provenant du système sympathique entraînera une perturbation de l'homéostasie calcique, pouvant perturber l'ouverture de canaux ioniques activés par le calcium et ainsi déclencher des arythmies.

Des lésions attribuables à de nombreuses anomalies et maladies du cœur peuvent être à l'origine d'une arythmie. Par exemple, une cardiomyopathie peut aboutir à différents troubles du rythme. La cardiomyopathie conduit un remodelage progressif du cœur qui empêche le muscle cardiaque de pomper le sang efficacement. Les origines de la cardiomyopathie sont nombreuses. La cardiomyopathie peut être liée à une mutation génétique donc héréditaire ou bien attribuable à l'hygiène de vie, le diabète ou à la suite d'une crise cardiaque ayant entraîné des dommages du muscle cardiaque. Il existe différents types de cardiomyopathies dont la cardiomyopathie hypertrophique, qui est la plus courante, la cardiomyopathie dilatée ou bien la cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (Brieler, Breeden, and Tucker 2017).

II. La cardiomyopathie arythmogène

La cardiomyopathie arythmogène (CA) est une pathologie autosomale dominante caractérisée par des anomalies structurelles et fonctionnelles du ventricule. L'apparition d'arythmies ventriculaires constitue le signe clinique majeur de la pathologie (C. Basso et al. 1996). Cette pathologie peut débuter par une atteinte du ventricule droit et a donc longtemps été nommée la cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (CAVD). Cependant, de plus en plus de cas cliniques rapportent une implication du ventricule gauche et des formes bi-ventriculaires (Sen-Chowdhry et al. 2010). Ceci a amené la communauté scientifique à adopter une nouvelle dénomination pour la CAVD en CA. La prévalence de la CA est estimée entre 1/1000 et 1/5000 avec une pénétrance liée à l'âge, ce qui la classe dans la catégorie des maladies rares. Les symptômes cliniques sont généralement présents au cours des troisièmes à quatrièmes décennies de la vie, malgré un diagnostic précoce chez certains jeunes patients à l'effort (Thiene et al. 1988). Cette pathologie est souvent associée à une maladie touchant des canaux ioniques, car les épisodes arythmiques surviennent avant l'apparition d'anomalies structurelles (Austin et al. 2019). Ainsi, le diagnostic précoce et spécifique pose encore des défis.

1. Aspect Physiopathologique

La CA se caractérise notamment par une perte progressive du myocarde, accompagnée par un remplacement fibro-adipeux, initialement localisé puis diffus, dans le myocarde selon la progression de la pathologie. L'infiltration fibro-adipeuse peut débuter dans le ventricule droit entre la partie antérieure de l'infundibulum pulmonaire (1), l'apex (2) et la paroi inféro-postérieure (3) et s'étend progressivement à l'endocarde (Asimaki, Kleber, and Saffitz 2015). Cette région correspond au triangle de dysplasie, figure 13A.

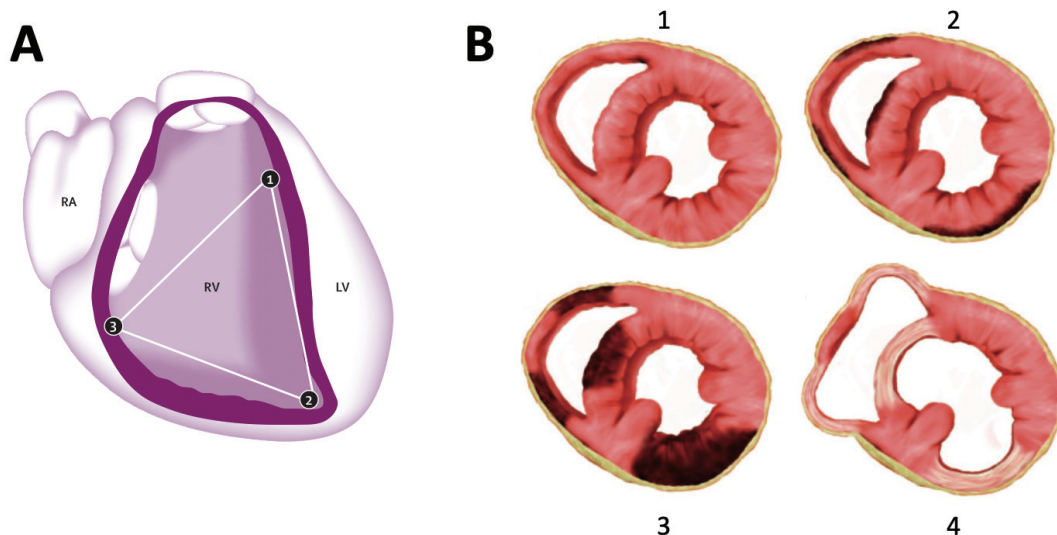


Figure 13 : Caractéristique morphologique de la cardiomyopathie arythmogène

- (A) Représentation du triangle dysplasique qui montre les zones caractéristiques des anomalies structurales du ventricule droit. 1 infundibulum pulmonaire, 2 apex et 3 parois inféro-postérieur.
- (B) Développement de la cardiomyopathie arythmogène. 1 A la naissance le cœur est structurellement sain, puis 2 les lésions myocardiques apparaissent au niveau de l'épicaire pour s'étendre jusqu'à l'endocarde 3. Enfin en 4, la paroi cardiaque s'amincit avec un remplacement fibro-adipeux

Basso et al. 2009; Hoorntje et al. 2017

RA: oreillette droite; RV: ventricule droit; LV: ventricule gauche

La CA est une maladie progressive comprenant plusieurs phases, comme montré dans la figure 13B. La phase initiale est nommée « *concealed phase* », car elle présente très peu, voire aucun, changement structurel, avec une susceptibilité accrue au développement d'arythmies ventriculaires. La seconde phase se caractérise par des signes cliniques d'arythmies aboutissant à des anomalies fonctionnelles du ventricule droit. Les premiers signes morphologiques sont aussi constatés avec la présence d'inclusion fibro-adipeuse localisée. A ce stade, les patients peuvent subir des palpitations, des syncopes et des arrêts cardiaques (Hoorntje et al. 2017; Asimaki, Kleber, and Saffitz 2015). La progression de la maladie entraîne le développement de la troisième phase : l'insuffisance cardiaque. Cette insuffisance est notamment causée par un appareil contractile défectueux. La dernière phase est marquée par une atteinte manifeste du ventricule gauche et une insuffisance cardiaque biventriculaire. En effet, les patients montrent une insuffisance biventriculaire accompagnée d'une dysfonction systolique. La CA gauche se caractérise par une implication primaire, mais pas exclusive du ventricule gauche, tandis que la forme biventriculaire est définie par une implication précoce et parallèle des deux ventricules (Sen-Chowdhry et al. 2010). A ce stade, la CA peut mimer une cardiomyopathie dilatée avec plusieurs complications comme la fibrillation atriale et des

événements thromboemboliques (Corrado, Basso, and Judge 2017). La transplantation cardiaque devient à ce stade la seule thérapie efficace.

Des études de l'ultrastructure du myocarde sur des biopsies de patients ont montré un remodelage au niveau des disques intercalaires avec une perte des desmosomes (Cristina Basso et al. 2006). Ceci suggère une implication des desmosomes conduisant à une perturbation des jonctions intercellulaires accompagnées d'un détachement des cardiomyocytes et une mort cellulaire. Ce découplage cardiomyocytaire peut être aggravé avec l'exercice physique. En effet, un effort physique augmente la pression des ventricules entraînant un stress plus important de la paroi du myocarde (La Gerche et al. 2011). L'activité sportive augmente donc le risque de mort subite cardiaque chez le sujet jeune.

2. Aspect clinique

Les premières manifestations cliniques se produisent durant la phase dite silencieuse (*concealed phase*) et sont typiquement causées par des arythmies ventriculaires. Les plus communes des présentations cliniques sont des palpitations et des syncopes chez l'adolescent ou le jeune adulte. Il est possible d'observer sur l'électrocardiogramme (ECG) une inversion de l'onde T. Un défaut de conduction à travers le ventricule droit peut aussi se traduire par une dépolarisation anormale sur l'électrocardiogramme (Corrado, Basso, and Judge 2017). Cependant le diagnostic par l'ECG reste compliqué, car l'activité électrique du ventricule droit peut être masquée par l'activité électrique du ventricule gauche, en raison de la faible masse du ventricule droit par rapport à celle du ventricule gauche. Les arythmies ventriculaires, parfois de simples extrasystoles peuvent dégénérer en fibrillation. Il est important de noter, qu'une stimulation bêta adrénergique peut aggraver ces arythmies (Marcus et al. 2009). Sur des études d'imageries, l'altération du ventricule droit présente une dilatation et l'apparition de tissu adipeux dans le myocarde. Ceci induit un dysfonctionnement global du ventricule suivi d'anomalie de mouvement de la paroi du ventricule tel qu'une akinésie systolique ou une dyskinésie. Une étude exploratoire d'imagerie par résonance magnétique fournit des informations complémentaires concernant la présence ainsi que la quantité de cicatrices myocardiques (Sen-Chowdhry et al. 2010). Au stade final de la maladie la fonction pompe du cœur ne peut plus être assurée à la suite du remodelage structurel profond des ventricules. A ce jour, il n'existe pas d'outil de diagnostic pour identifier précocement les personnes atteintes de la CA.

3. Aspect génétique

a) Mutations desmosomales

Des observations de plusieurs familles porteuses de la pathologie ont montré une base génétique pour la CA. Dans 50% des cas, les mutations sont retrouvées sur les gènes desmosomaux, figure 14 (Quarta et al. 2011; J. A. Groeneweg et al. 2014).

Plakophiline-2

Parmi ces gènes desmosomaux, la PKP2 est le gène le plus fréquemment muté (45% des cas) dans cette pathologie (Gerull et al. 2004). Dans la plupart des cas, les mutations se trouvent dans la partie C-terminale de la protéine, bien que des mutations affectant d'autres domaines aient été rapportées. (Mertens, Kuhn, and Franke 1996). Des souris KO (*Knock-Out*) homozygotes pour la PKP2 présentent une létalité embryonnaire causée par des défauts de structuration cardiaque et une fragilité du myocarde. Cette étude montre une rétraction des filaments intermédiaires dans le cytoplasme, démontrant l'importance de la PKP2 pour le recrutement de la desmoplakine et le maintien du cardiomyocyte (Grossmann et al. 2004). Ces résultats illustrent bien ce qui est constaté chez les patients atteints de la CA.

Desmoplakine

La seconde protéine desmosomale le plus souvent mutée (3% des cas) est la DSP. Une mutation dominante (S299R) sur le gène codant pour la DSP a été retrouvée chez un patient atteint de la CA (Rampazzo et al. 2002). Cette mutation se trouve au niveau N-terminale de la protéine, responsable de la liaison avec la Pkg et induit une forme tronquée de la protéine due à l'apparition prématurée d'un codon stop. La forme immature de la protéine induite par la mutation provoque une dimérisation de la DSP, formant des agrégats protéiques au niveau des desmosomes. De plus, il a été suggéré que des mutations sur ce gène soient plus fréquemment à l'origine de formes biventriculaires de la CA (Castelletti et al. 2017). Il est important de noter que les mutations atteignant la PKP2 sont retrouvées le plus fréquemment chez les cohortes de patients adultes, alors que les mutations de la DSP sont le plus souvent retrouvées chez les patients jeunes (Te Riele et al. 2015; Bauce et al. 2011; Gerull et al. 2004). De plus, les patients portant une mutation sur la DSP présentent une dilatation plus importante du ventricule droit, ce qui suggère une gravité plus importante en cas de mutation sur ce gène (Bauce et al. 2011).

Cadhérines desmosomales

Des mutations sur les cadhérines desmosomales sont retrouvées dans la CA. Des mutations sur la DSG2 représentent 4% des cas alors que les mutations sur la DSC2 représentent 2% des cas (Judith A. Groeneweg et al. 2015). Ces cadhérines sont synthétisées comme des pro-protéines et subissent un clivage post-transcriptionnel, par une protéase, afin d'être pleinement fonctionnelles. Différentes mutations ont été identifiées pour induire un défaut de maturation de ces protéines, ce qui provoquerait une déstabilisation du desmosome (Awad et al. 2006; Heuser et al. 2006; Simpson et al. 2009). D'autres mutations peuvent induire un défaut d'adressage de ces protéines, perturbant leur localisation à la membrane (Gehmlich et al. 2011).

Plakoglobine

Enfin, les mutations atteignant la Pkg sont les plus rares. En effet, elles ont une fréquence d'apparition de 1% des cas de CA (Judith A. Groeneweg et al. 2015). Comme décrit précédemment, la Pkg est une γ -caténine et interfère avec la β -caténine pour inhiber la voie de signalisation Wnt. Il a été rapporté que des mutations sur cette protéine pouvaient interférer avec cette voie de signalisation (Asimaki et al. 2007; McKoy et al. 2000).

Les mutations causant la CA ont pour conséquence de perturber les interactions cellules-cellules et altérer les fonctions d'attachements et de signalisation des disques intercalaires.

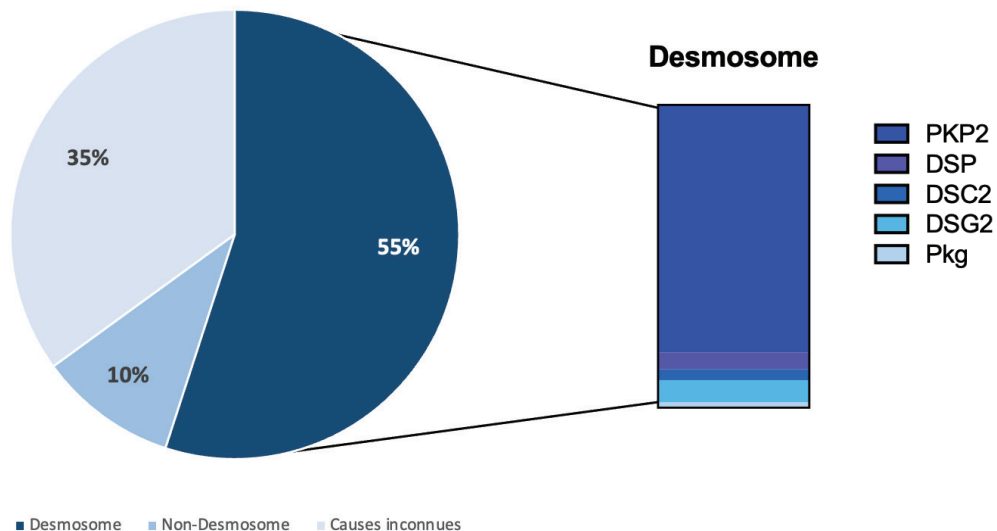


Figure 14 : Pourcentage des mutations impliquées dans la cardiomyopathie arythmogène

Les mutations impliquant les gènes desmosomiaux représentent plus de 50% des mutations dans le cadre de la CA et 10% des mutations impliquent des gènes non-desmosomiaux tels que le $Nav1.5$, le RYR2 ou le $TGF\beta$. Parmi les mutations des gènes desmosomiaux, les mutations sur la PKP2 représentent 45% des mutations desmosomiales, la DSP 3%, la DSC2 2%, la DSG2 4% et la Pkg 1%. 35% des causes de la CA sont restés inconnus.

b) Mutations non-desmosomales

D'autres mutations causant la CA ont également été retrouvées chez des gènes ne codant pas pour des protéines desmosomales. Ces mutations représentent les 10% des mutations responsables de la CA (Lazzarini et al. 2015). Elles affectent des gènes codant pour des protéines assurant des fonctions biologiques diverses telles que des protéines du cytosquelette, de l'homéostasie calcique, du transport sodique ou encore de la signalisation de cytokines, figure 14. Il est important de noter que dans 35% des cas de patients, aucun variant génétique n'a pu être identifié, ce qui suggère une étiologie plus hétérogène avec des facteurs polygéniques et environnementaux contribuant à l'expression phénotypique (Judith A. Groeneweg et al. 2015). Le pourcentage des mutations est illustré dans la figure 14.

Protéine du cytosquelette

La desmine fait partie des filaments intermédiaires exprimés dans les cellules cardiaques et relie les disques Z des sarcomères aux costamères. Ceci permet de coordonner les mouvements lors de la contraction des cardiomyocytes. Les mutations de la desmine sont associées aux myopathies squelettiques ainsi qu'aux cardiomyopathies dilatées et restrictives. Les résultats suggèrent que des mutations particulières de la desmine sont associées à de rares cas de CA (Lorenzon et al. 2013).

La protéine transmembranaire 43 (TMEM43) est une protéine impliquée dans l'organisation membranaire du noyau. Des mutations, au niveau du gène codant pour cette protéine, ont été décrites en lien avec la CA (Merner et al. 2008).

La titine est la plus grande protéine humaine et fonctionne comme un ressort bidirectionnel, générant une rigidité passive dans les cardiomyocytes. Les mutations tronquant la titine sont considérées comme la cause génétique la plus fréquente de cardiomyopathie dilatée (Granzier et al. 2005). L'analyse fonctionnelle de la protéine titine mutante a mis en évidence une altération de la cinétique de repliement entraînant une sensibilité accrue à la protéolyse et à la dégradation entraînant une altération structurelle de la titine (Taylor et al. 2011). Des mutations sur la titine sont donc maintenant considérées comme une cause potentielle de la CA.

Protéine de l'homéostasie calcique

Des mutations des gènes codant des protéines responsables de la régulation de l'homéostasie du calcium ont également été impliquées dans la CA et mettent en évidence un

mécanisme arythmogène (Roux-Buisson et al. 2014; van der Zwaag et al. 2012). Le PLB, décrit précédemment, régule l'homéostasie calcique par l'intermédiaire de son interaction avec la SERCA. Des mutations du PLB ont été associées à des cardiomyopathies dilatées, hypertrophiques et arythmiques (van der Zwaag et al. 2012). Il a également été rapporté qu'une mutation entraînant une délétion d'une région particulière du PLB provoque à la fois une cardiomyopathie dilatée et la CA, reflétant probablement un spectre de maladies et un chevauchement clinique de ces pathologies (van der Zwaag et al. 2012; Sepehrkhoy et al. 2017).

Le RYR est un des acteurs majeurs dans le processus de couplage excitation-contraction. Différentes études ont trouvé quatre mutations faux sens sur le gène codant pour le RYR pouvant induire la CA (Tiso et al. 2001; Laitinen et al. 2001). De telles mutations provoquent des fuites calciques appelées Ca^{2+} sparks provenant du RS pendant la diastole. Ces Ca^{2+} sparks peuvent déclencher des DADs aboutissant à des troubles du rythme (Laitinen et al. 2001).

Canal sodique voltage dépendant

Comme vu précédemment, le canal sodique voltage dépendant ($Na_v1.5$) joue un rôle majeur dans la phase 0 du PA (Rook et al. 2012). Des mutations sur le gène *SCN5A* codant pour le canal $Na_v1.5$ ont été retrouvées pour être associées dans différentes pathologies, telles que le syndrome de Brugada, le QT long (Ruan, Liu, and Priori 2009; Remme, Wilde, and Bezzina 2008). Le syndrome de Brugada partage dans certains cas des caractéristiques phénotypiques avec la CA, d'où l'hypothèse d'une implication du canal $Na_v1.5$ dans la CA (Te Riele et al. 2017). Une mutation faux sens sur ce gène provoque une altération de l'activité du canal provoquant des tachycardies ventriculaires et des morts subites cardiaques (Te Riele et al. 2017).

Transforming growth factor β

Le *transforming growth factor β* (TGF β 3) est une cytokine jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire, l'activité inflammatoire et pro-fibrotique (Sporn and Roberts 1992). Beffagna et collaborateur ont été les seuls à identifier des mutations la région 3' et 5' UTR du TGF β 3 sur une cohorte de patients dans le cadre de la CA (Beffagna et al. 2005). Ces mutations seraient responsables de la fibrose du myocarde dans la pathologie. A noter que le TGF β 3 est la seule protéine sécrétée impliquée dans la pathogenèse de la CA jusqu'à présent et représenterait la première preuve suggérant un mécanisme impliquant la signalisation paracrine

et autocrine. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le TGF β 3 est associé à de rares cas de CA.

4. Pathogénèse

a) Perte des cardiomyocytes

La perte des cardiomyocytes est une caractéristique physiopathologique majeure de la CA, résultant en une perte progressive du muscle cardiaque et un amincissement de la paroi du myocarde. Ce processus constitue une étape importante dans la progression de la pathologie, conduisant au remplacement fibro-adipeux dans le cœur. Plusieurs explications peuvent élucider cette perte du myocarde ventriculaire.

La perte des cardiomyocytes pourrait être le résultat d'une lésion cellulaire, comme la perte du sarcolemme ou par le déclenchement du processus d'apoptose (Pilichou et al. 2009; D. Li et al. 2011). Les desmosomes étant fortement impliqués dans le maintien de l'intégrité du tissu, une mutation sur un des gènes desmosomaux peut induire une fragilisation de la connexion entre les cardiomyocytes. Cette fragilisation pourrait induire des blessures suite à la contraction cardiaque (Schlipp et al. 2014). Pour étayer cette idée, des examens pathologiques ont révélé une localisation anormale des protéines desmosomales en lien avec une perte du sarcolemme lié à des lésions mécaniques (D. Li et al. 2011; Bermúdez-Jiménez et al. 2018). L'effort physique ainsi qu'un stress environnemental, qui augmentent le stress mécanique du cœur, ont été rapportés pour accélérer la progression de la pathologie. Des études ont effectivement rapporté des cas de morts subites cardiaques liés à la CA chez le jeune athlète, alors que ces morts subites surviennent habituellement chez des patients plus âgés (Sawant et al. 2014). Ces observations ont également été rapportées chez un modèle murin (Lyon et al. 2014; Gerçek et al. 2017). L'ensemble de ces travaux supporte donc la possibilité d'une perte des cardiomyocytes soient causés par les forces mécaniques de la contraction cardiaque dans un environnement fragile.

D'autres facteurs peuvent expliquer cette mort cellulaire, comme la transduction de signaux messagers induisant une apoptose cellulaire. En effet, de nombreuses études témoignent la présence d'une apoptose cellulaire dans des échantillons de patients et sur des modèles murins (Mallat et al. 1996; Valente et al. 1998). En effet, l'analyse cellulaire démontre une augmentation d'expression de gène pro-apoptotique tel que la protéase CPP-32 ou *PERP* (un facteur de transcription pro-apoptotique) (Z. Yang et al. 2006; Akdis et al. 2016).

Il est important de mentionner que la mort des cardiomyocytes n'est peut-être pas la seule cause de l'infiltration fibro-adipeuse dans le cœur de patient. En effet, comme décrit plus tôt, des mutations non desmosomales entraînent une atteinte morphologique sans avoir un tissu fragilisé

dû à la déstabilisation du desmosome. Ceci pourrait indiquer que les cardiomyocytes ne meurent pas mais pourraient se transformer en cellule adipeuse (d'Amati et al. 2000).

b) Fibrose

Le phénomène de fibrose est un évènement délétère et survient en réponse à une blessure cardiaque telle que l'ischémie ou un infarctus du myocarde. Cependant, les mécanismes qui permettent l'infiltration fibro-adipeuse dans le cadre de la CA demeurent mal compris.

Des études ont montré que la voie de signalisation du TGF β , qui est une cytokine pro fibrotique dans le cœur, joue un rôle important dans la fibrose (Khalil et al. 2017; Leask 2007). En effet, le TGF β se lie à une série de récepteurs membranaires, entraînant la phosphorylation et l'activation de facteur de transcription SMAD. Ceci induit l'expression de gène pro-fibrotique (Leask 2007). Parmi ces gènes, la voie de signalisation du TGF β augmente l'expression de protéines impliquées dans la matrice extracellulaire et inhibe l'expression de métalloprotéinases (Leask 2015). La fibrose fait aussi intervenir la voie non-canonique du TGF β . Cette voie est connue pour activer la voie des mitogen-activated protein (MAP) kinase ainsi que des espèces réactives de l'oxygène. Cette voie est aussi impliquée dans la fibrose myocardique, l'apoptose et l'hypertrophie. La voie des MAPK a été observée pour induire une hypertrophie, une apoptose et une fibrose cardiaque (L. Yu, Hébert, and Zhang 2002).

c) Adipogenèse

L'adipogenèse est le processus de différenciation qui permet d'obtenir des adipocytes matures. Dans le cadre de la CA, le phénomène de lipogenèse, qui est le processus de stockage de lipide dans la cellule, est également présent. Les adipocytes proviennent des cellules stromales du mésenchyme qui se différencient en lipoblastes puis en pré-adipocytes et enfin en adipocytes matures (Gregoire, Smas, and Sul 1998). Cette différenciation adipogénique est complexe et fait intervenir différents facteurs de transcription afin d'induire l'expression de gènes pro-adipogénique. Les deux facteurs activés précocement durant l'adipogenèse sont les *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBP) β et δ . Ces facteurs vont ensuite augmenter l'expression de deux autres facteurs clés tels que le C/EBP α et le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) (Lefterova et al. 2014). Dans le cadre de la pathologie, deux questions sont en suspens à savoir quelle est la source des adipocytes et quels signaux stimulent la voie adipogénique.

5. Voie de signalisation impliquée dans l'adipogenèse

a) Voie de signalisation WNT

La voie de signalisation Wnt participe aux processus développementaux durant l'embryogenèse et est impliquée dans le maintien de l'homéostasie du tissu adulte (Logan and Nusse 2004). En condition physiologique, l'activation de cette voie Wnt par un ligand, provoque l'inhibition de la dégradation de la β -caténine. Normalement, la β -caténine se lie aux cadhérines au niveau des jonctions cellulaires. L'excès de β -caténine est dégradé dans le cytoplasme *via* un complexe de destruction : APC (*adenomatous polyposis coli*), Axine, GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*). L'activation de cette voie se produit lorsqu'un ligand de la famille Wnt (Wingless) se lie à son récepteur Frizzled. Ceci induit l'activation d'une cascade d'évènements qui conduit à la stabilisation et l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme. La β -caténine est ensuite transloquée dans le noyau afin de se lier aux facteurs de transcriptions de la famille T-cell factor/lymphoid enhancer facteur (TCF/LEF). Ces facteurs de transcriptions induisent la prolifération cellulaire, la spécification cellulaire incluant la différenciation des cardiomyocytes ainsi que le maintien de leur identité cellulaire (J. Li et al. 2011).

En revanche des études ont montré qu'une répression de la voie Wnt/ β -caténine pouvait induire une adipogenèse (Takemaru et al. 2003; Topol et al. 2003). En effet, l'inhibition de la voie Wnt par des antagonistes empêche la liaison de la β -caténine avec ses facteurs de transcription cibles. Dans le cadre de la CA, cette répression de la voie Wnt est médiée par la Pkg. En effet, la Pkg, qui est une γ -caténine rentre en compétition avec la β -caténine dans le noyau et inhibe ainsi la voie de signalisation Wnt (Lombardi et al. 2011). L'inhibition de la voie Wnt par la Pkg promeut l'activation de voies pro-adipogéniques telle que la voie PPAR γ , illustrée dans la figure 15. Cette voie est activée chez des cellules pré-adipocytes mais également chez les cardiomyocytes, ce qui supporte l'hypothèse d'une différenciation des cardiomyocytes en adipocytes (Garcia-Gras et al. 2006; E. Sommariva et al. 2016; Lombardi et al. 2011).

b) Voie de signalisation Hippo/YAP

La voie de signalisation Hippo/Yap a été montré pour être aussi impliquée dans la pathogenèse de la CA, comme montré dans la figure 15 (S. N. Chen et al. 2014). Cette voie de signalisation régule la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation (Heallen et al. 2013; Z. Lin et al. 2014). Son activation dépend des signaux mécaniques et des contacts intercellulaires. En effet, dans des conditions physiologiques où les cellules sont parfaitement liées, la voie YAP est activée (*Yes-associated protein*). Ceci va induire la translocation de YAP

dans le noyau et, avec WWTR1 (*WW domain-containing transcription regulator protein 1*), aussi appelé TAZ, vont co-activer l'expression de gènes anti-apoptotiques stimulant la prolifération (F.-X. Yu, Zhao, and Guan 2015). Cependant dans le cadre de la CA, où les connections intercellulaires sont fragilisés, YAP est phosphorylé par une cascade de kinase de la voie Hippo, qui va induire sa dégradation. De plus, une partie de YAP phosphorylé va interagir avec la β -caténine, ce qui inhibe la voie Yap ainsi que la voie Wnt (S. N. Chen et al. 2014).

c) PPAR γ

PPAR γ fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription essentiel à la différenciation des adipocytes. Sa structure contient deux domaines de liaison aux ligands : la région N-terminale a une fonction d'activation indépendante à la liaison d'un ligand alors que sa partie C-terminale est dépendante d'une liaison au ligand. PPAR γ possède également un domaine de liaison à l'ADN afin de jouer un rôle dans l'activation de gène (Ahmadian et al. 2013). En effet, l'absence de ligand favorise la liaison du PPAR γ avec des récepteurs nucléaires répresseurs qui recrutent des histones désacétylases afin de réprimer la transcription. A l'inverse, la présence d'un ligand favorise l'interaction de PPAR γ avec des co-activateurs tels que le récepteur rétinol X (*retinoid X receptors* RXR en anglais) qui induisent la transcription de gènes (Tontonoz and Spiegelman 2008). Les ligands physiologiques du PPAR γ sont encore mal connus. Cependant, quelques métabolites lipidiques ont été retrouvés pour être des activateurs de PPAR γ , tels que les acides gras insaturés ainsi que des prostaglandines (Schupp and Lazar 2010). Ces activateurs possèdent néanmoins une faible affinité pour PPAR γ d'où l'hypothèse de la présence d'autres ligands naturels (Schupp et al. 2007). Une relation réciproque entre PPAR γ et la voie de signalisation Wnt a été démontrée notamment dans la CA, potentiellement *via* une interaction directe entre PPAR γ et la β -caténine favorisant la dégradation de cette dernière (Liu et al. 2006; Vallée et Lecarpentier 2018). En effet, un modèle murin muté pour la Dsp a supprimé la voie Wnt et augmenté l'expression de PPAR γ (Garcia-Gras et al. 2006). De plus, une autre étude démontre une diminution de l'activité de la β -caténine accompagnée d'une lipogenèse liée à l'augmentation de PPAR γ (Kim et al. 2013). Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer à quel moment se produit l'augmentation de PPAR γ et déterminer l'importance fonctionnelle de cette voie chez les patients atteints de CA.

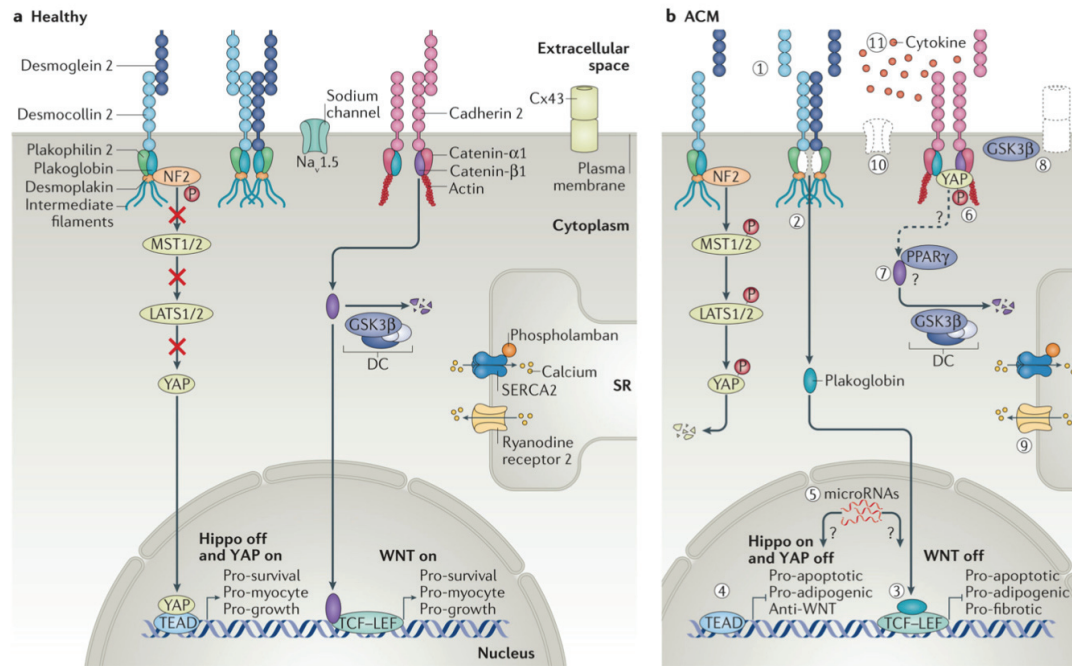


Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans la cardiomyopathie arythmogène

En condition contrôlée, à gauche, les cardiomyocytes forment des jonctions fortes avec les cellules voisines. Dans cette condition, NF2 est phosphorylé et YAP est activable pour favoriser la survie cellulaire. De plus la plakoglobine est retenue à la membrane et la voie de signalisation Wnt n'est pas réprimée par cette dernière. Dans ces conditions le niveau de PPAR γ est basal. En condition pathologique, à droite, la dissociation du desmosome induit l'activation de la voie Hippo et la répression de YAP qui est dégradé par le protéasome. De plus la Pkg, qui est une γ -caténine, va être transloquée jusqu'au noyau et rentrer en compétition avec la β -caténine et inhiber la voie Wnt. De plus, la cellule surexprime PPAR γ . La dérégulation de ces voies de signalisation a pour conséquence d'activer les gènes pro-apoptotiques et pro-fibro/adipogéniques induisant un remodelage morphologique de la cellule. Austin et al. 2019

6. Source cellulaire des adipocytes

Plusieurs types cellulaires pourraient expliquer l'infiltration fibro-adipeuse qui survient dans les ventricules, comme décrits dans la figure 16. Les premières hypothèses se sont concentrées sur les cellules souches cardiaques adultes comme source de substitution fibro-adipeuse (Stadiotti et al. 2017).

Parmi ces cellules souches, on retrouve les cellules progénitrices cardiaques qui expriment les protéines desmosomales. Des études chez la souris ont montré l'implication de cellules exprimant le marqueur multipotent Isl-1 comme source d'adipogenèse (Lombardi et al. 2009; Cohen et al. 2007). Cette hypothèse est corroborée par la co-expression des marqueurs Isl-1 et des facteurs de transcription adipogénique chez des cœurs de patient atteint de la CA (Lombardi et al. 2009). Il a été suggéré que le changement pour la voie adipogénique de ces cellules était dû à la translocation de la plakoglobine à la membrane, inhibant la voie de signalisation Wnt (Cohen et al. 2007). Cependant, le faible nombre de pré-adipocytes exprimant

Isl-1 ne peut pas expliquer la forte fibrose retrouvée dans les cœurs des patients atteints de la CA (Lombardi et al. 2009).

De plus, les progéniteurs cellulaires c-kit/Sca1 ont aussi été proposés comme précurseurs des adipocytes (Lombardi et al. 2011). Les marqueurs c-kit et Sca1 sont des marqueurs reconnus de cellules souches pluripotentes dans le système hématopoïétique. Des études histologiques sur ces cellules provenant de souris transgénique sur-exprimant la Pkg ont montré une augmentation du nombre d'adipocytes et d'apparitions de fibrose dans le cœur (Lombardi et al. 2011). Cependant, leur faible nombre suggère que seulement une faible proportion d'adipocytes sont originaires de ces cellules (E. Sommariva et al. 2016).

Des études se sont penchées sur l'implication de cellules pluripotentes cardiaques telles que les cellules stromales mésenchymateuses cardiaques (SMC) (E. Sommariva et al. 2016; Lombardi et al. 2016). Ces cellules sont originaires de l'épicaire et participent au maintien structurel du cœur. Elles sont pluripotentes et sont impliquées dans le remodelage cardiaque en condition pathologique. Leur implication dans la CA a été montrée par des biopsies de patients, où ces cellules mésenchymateuses ont été isolées et remises en culture. Dans ces conditions, ces cellules se sont différenciées en adipocytes (E. Sommariva et al. 2016). Une autre source adipogénique potentielle provenant de cellules pluripotentes a été découverte chez les progéniteurs fibro-adipeux (PFA) cardiaques. En effet, Lombardi et collaborateur ont montré qu'une mutation sur un gène codant pour une protéine desmosomale peut différencier ces cellules en adipocytes. Ils ont estimé que 40% des adipocytes, chez le cœur de patients atteint de la CA, étaient originaires des PFA (Lombardi et al. 2016).

7. Hypothèse de Transdifférenciation

La majorité des études portant sur la CA mentionnent un phénomène de transdifférenciation des cardiomyocytes comme source de remplacement fibro-adipeux (Fujita et al. 2008; d'Amati et al. 2000). D'Amati et collaborateur ont été les premiers à rapporter ce phénomène par des études histologiques, immunochimique et d'analyses de l'ultrastructure dans des échantillons cardiaques humains (d'Amati et al. 2000). En effet cette étude rapporte un marquage positif à la vimentine, une protéine exprimée chez les adipocytes, dans quelques cardiomyocytes. Ces cellules seraient donc une transition entre des cardiomyocytes et des adipocytes. De plus, une seconde étude a rapporté ce phénomène de transdifférenciation où les cellules myocardiques avaient de fortes similarités avec un adipocyte. L'analyse de ce groupe de cellules révèle un changement nucléaire polymorphe, une vacuolisation périnucléaire et enfin une accumulation de gouttelettes lipidiques (Fujita et al. 2008). Il est important de noter

que l'accumulation lipidique dans les cardiomyocytes (lipogenèse) affecte la bonne fonction contractile (Zhou et al. 2000). Comme dit précédemment, ce phénomène est soutenu par l'idée qu'une déstabilisation du desmosome entraîne la translocation de la Pkg depuis la membrane vers le noyau inhibant ainsi l'action de la β -caténine. Ceci a été pour la première fois décrit *in-vitro* par Garcia-Gras et collaborateurs (Garcia-Gras et al. 2006). La transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes est un phénomène complexe à observer et fait toujours débat. Récemment, la découverte et des études poussées sur des cardiomyocytes issus d'iPSC ont permis de visualiser ce phénomène et d'approfondir ce mécanisme (Kim et al. 2013; D. Ma et al. 2013; Caspi et al. 2013).

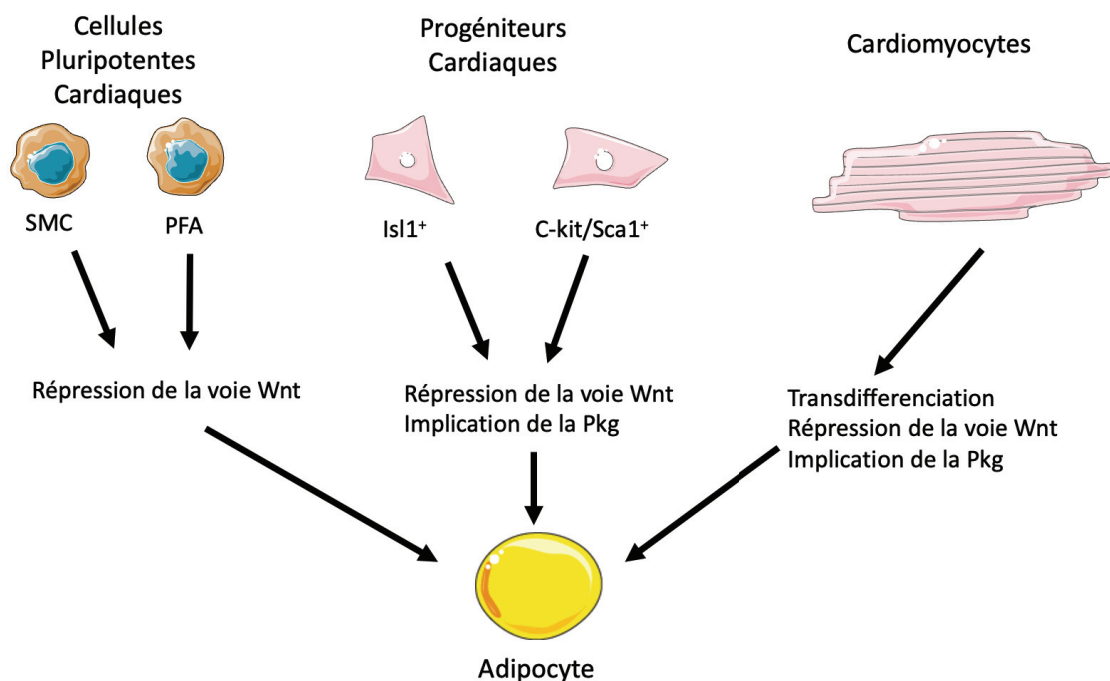


Figure 16 : Schéma récapitulatif des cellules sources des adipocytes dans la cardiomyopathie arythmogène

Le remplacement adipeux dans le cadre de la CA peut provenir de plusieurs sources. Les cellules stromales mésenchymateuses cardiaques (SMC) et les progéniteurs fibro-adipeux (PFA) peuvent être des sources d'adipogenèse. Les progéniteurs cardiaques exprimant Isl1⁺ et C-kit/Sca1⁺ sont également des sources d'adipocytes. Enfin la transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes est une hypothèse possible dans le remplacement adipeux. Toutes ces sources démontrent une implication de la Pkg et une répression de la voie Wnt.

8. Traitement et prévention de la CA

L'objectif le plus important dans le traitement des patients atteints de la CA est la prévention des morts subites cardiaques. Les options thérapeutiques reposent actuellement sur un changement de mode de vie, l'utilisation de β -bloquants, de médicaments anti-arythmiques, l'ablation par cathéter et/ou la transplantation cardiaque (Mitchell et al. 2005; Wichter et al. 1992; Bai et al. 2011).

L'exercice physique étant le principal facteur environnemental, il est donc recommandé aux patients diagnostiqués de la CA de diminuer voire d'arrêter leur activité physique. De plus, une activité physique à haute intensité peut entraîner des lésions cardiaques favorisant la progression de la pathologie. L'utilisation de β -bloquants est également considérée comme un traitement anti-adrénergique supplémentaire en raison de sa capacité à réduire le risque d'arythmies induites par l'exercice (Corrado et al. 2015; Mitchell et al. 2005; Cruz et al. 2015). Des molécules anti-arythmiques telles que le sotalol, l'amiodarone et le vérapamil ou les β -bloquants sont fortement utilisés chez les patients atteints de la CA (Ermakov and Scheinman 2015; Wichter et al. 1992). Cette thérapie est souvent combinée avec une ablation par cathéter. L'ablation par cathéter est donc utilisée en raison d'une automaticité accrue et la génération de boucle de réentrée dans le cœur. Cette approche a un fort taux de réussite dans la diminution des arythmies (Bai et al. 2011). Cependant les patients présentent des rechutes en raison de la progression de la maladie entraînant une aggravation du remplacement fibro-adipeux. Ceci créant de nouvelles zones propices à des boucles de réentrées (Marchlinski et al. 2004; Dalal et al. 2007).

Un traitement pharmacologique visant à inhiber l'angiotensine II ou l'utilisation de diurétique est utilisé chez les patients qui développent un dysfonctionnement symptomatique du ventricule droit (Corrado et al. 2015).

Toutes ces thérapies ont pour but de limiter les conséquences de la progression de la maladie, retardant ainsi le plus possible la transplantation cardiaque. Cependant cette méthode est le dernier recours dans le traitement en cas d'insuffisance cardiaque potentiellement mortelle. Une étude de suivi a rapporté des taux de survie post-transplantation de 94 % et 88 % à 1 et 6 ans, respectivement (Tedford et al. 2012).

III. Les cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Au cours des dernières années, les modèles de lignées cellulaires ou de modèles animaux nous ont permis de mieux appréhender et comprendre la physiopathologie. Cependant, ces modèles sont plus ou moins éloignés de l'Homme, ce qui rend les études limitées pour leur implication clinique. Les chercheurs essaient donc de se rapprocher le plus fidèlement possible de l'Homme. En plus de leur limitation à représenter la physiologie humaine, les modèles animaux sont confrontés à d'autres problèmes tels que les coûts de maintenances ainsi que les problèmes éthiques. Ceci restreint de plus en plus l'utilisation des animaux dans les laboratoires.

Dans le cadre des pathologies cardiaques, il est très difficile d'obtenir des échantillons de patients ou de sujet sain. De nouvelles alternatives sont développées afin d'étudier la physiopathologie, dans des conditions les plus proches possibles de l'Homme, avec le moins de problèmes éthiques.

1. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes sont communément appelées ESC, pour *Embryonic Stem Cells* et proviennent de la masse interne formée au stade blastocyste, 4 à 5 jours après la fécondation. Les ESC constituent un intérêt majeur pour la recherche et la thérapie par leur propriété de pluripotence et d'auto-renouvellement.

La capacité d'auto-renouvellement permet aux cellules souches de se renouveler indéfiniment par division, que l'on appelle division symétrique, qui donne naissance à deux cellules filles identiques entre elles et identiques à la cellule mère. Il existe également la division asymétrique, où l'une des deux cellules filles va s'engager dans une voie de différenciation, mais cela diminue le nombre total de cellules souches indifférenciées.

La seconde caractéristique est la pluripotence. Les ESC pluripotentes sont capables de se différencier vers les 3 feuillets embryonnaires qui sont l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Cette caractéristique leur confère donc la capacité de former tous les types cellulaires adultes, dont les cardiomyocytes qui proviennent du mésoderme, ce qui nous intéresse dans le cadre des études sur la CA.

C'est ce potentiel pluripotent qui a vivement suscité l'intérêt des scientifiques. Ces cellules ont, pour la première fois, été isolées et cultivées en 1981 chez la souris puis en 1998 chez l'Homme (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981; Thomson et al. 1998).

Cependant, l'isolement de ces cellules implique la destruction du blastocyste et donc la destruction d'un embryon ce qui a causé des problèmes éthiques pour les expérimentateurs. La communauté scientifique a donc dû chercher une alternative avec le même potentiel de pluripotence et d'auto-renouvellement, sans avoir recours à un embryon humain (Ilic and Ogilvie 2017).

2. Les cellules souches pluripotentes induites

Yamanaka et collaborateurs, en 2006, ont réussi à convertir des cellules spécialisées de souris en cellules similaires aux ESC avec la même capacité de différenciation et une capacité suspectée similaire de pluripotence, qu'il a nommé cellules souches pluripotentes induites (ou *induced pluripotent stem cells* (iPSC) en anglais) (Takahashi and Yamanaka 2006). Il a ensuite reproduit cette expérience à partir de fibroblastes humains en 2007 (Takahashi et al. 2007). Pour ce faire, 4 facteurs de transcription (KLF4, OCT3/4, SOX2 et C-Myc) sont employés pour dédifférencier des fibroblastes matures en iPSC. Les cellules ainsi obtenues sont capables d'exprimer des facteurs embryonnaires tels que TRA1-60 ou SSEA-1 et se divisent « indéfiniment » tout en gardant leur pluripotence.

Par la suite différentes méthodes de reprogrammation ont été développées afin de reprogrammer des cellules somatiques en iPSCs. Il y a la méthode, dite intégrative, possédant la plus haute efficacité mais qui peut induire plus facilement des aberrations génétiques. Cette méthode repose sur l'insertion dans le génome de la cellule hôte, de séquence d'ADN étrangère codant pour des facteurs de reprogrammation. Une autre méthode, dite non-intégrative, est considérée comme plus sûre, car elle favorise moins des aberrations génétiques. Cette méthode repose sur l'utilisation de petites molécules ou micro-ARN afin de délivrer les facteurs de reprogrammation (Yamanaka 2012; Hou et al. 2013; Shi et al. 2017; X. Ma, Kong, and Zhu 2017).

Cette découverte permet aujourd'hui aux laboratoires de générer leurs propres iPSCs provenant de différents organismes y compris l'humain. Cette technologie permet l'étude sur des modèles *in-vitro* plus avancée et ciblant une pathologie d'intérêt (Moreau, Boutjdir, and Chahine 2017). Cette technologie présente de multiples applications dans la recherche fondamentale telles que la thérapie cellulaire, le *drug screening* et la modélisation pathologique, figure 17.

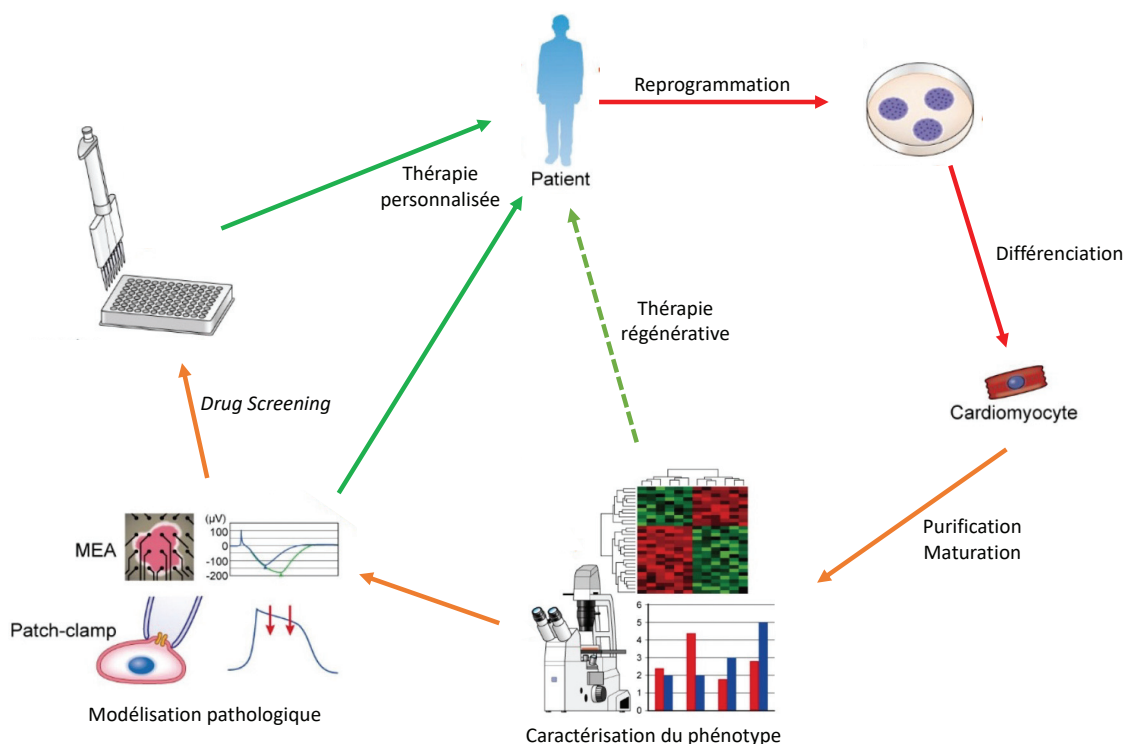


Figure 17 : Représentation récapitulative de l'utilisation de la technologie iPSC

Les cellules somatiques de patients porteurs de troubles héréditaires, tels que des troubles arythmogènes, sont reprogrammées en hiPSC à l'aide des facteurs de transcription décrits par Yamanaka. Les hiPSCs ont ensuite le potentiel de se différencier en n'importe quel type de cellule souhaité, comme les cardiomyocytes. Celles-ci peuvent être utilisées pour divers outils de recherche allant de la modélisation pathologique, le *Drug screening*, la médecine personnalisée à la thérapie cellulaire régénérative.

D'après Tanaka et al. 2015

a) La différenciation cardiaque

Dans le cadre de notre étude sur la CA, les hiPSC (pour *Human Induced Pluripotent Stem Cells*) nous permettent de modéliser cette pathologie à l'aide de cellules provenant directement du patient. Pour cela, nous utilisons la propriété de pluripotence des hiPSC pour les différencier en cardiomyocytes. Afin de différencier *in-vitro* les hiPSC en cardiomyocyte (hiPSC-CM), il est intéressant de comprendre les événements cellulaires et moléculaires de la cardiomyogenèse, notamment observés pendant le développement embryonnaire et illustré dans la figure 18.

Au stade de l'embryogenèse, les cellules cardiaques passent par plusieurs étapes de différenciation avant d'atteindre leur maturité. Ces cellules dérivent, à partir de l'épiblaste pluripotent, en mésoderme puis en mésoderme cardiaque, puis se transforment pour donner des

progéniteurs cardiaques. Ces derniers vont finalement évoluer en cardiomyocytes matures et fonctionnels. Ces étapes de différenciation et maturation sont finement régulées par des facteurs de croissance provenant de l'endoderme. Les voies de signalisation activées pour le processus de différenciation cardiaque sont les voies Wnt (*Wingless/INT*), le FGF (*Fibroblasts Growth factor*) et la famille des ligands au TGFβ (*Transforming Growth factor-beta*). Le processus de différenciation cardiaque *in-vitro* va simuler, à l'aide de cytokines, l'activation de ces voies de signalisation.

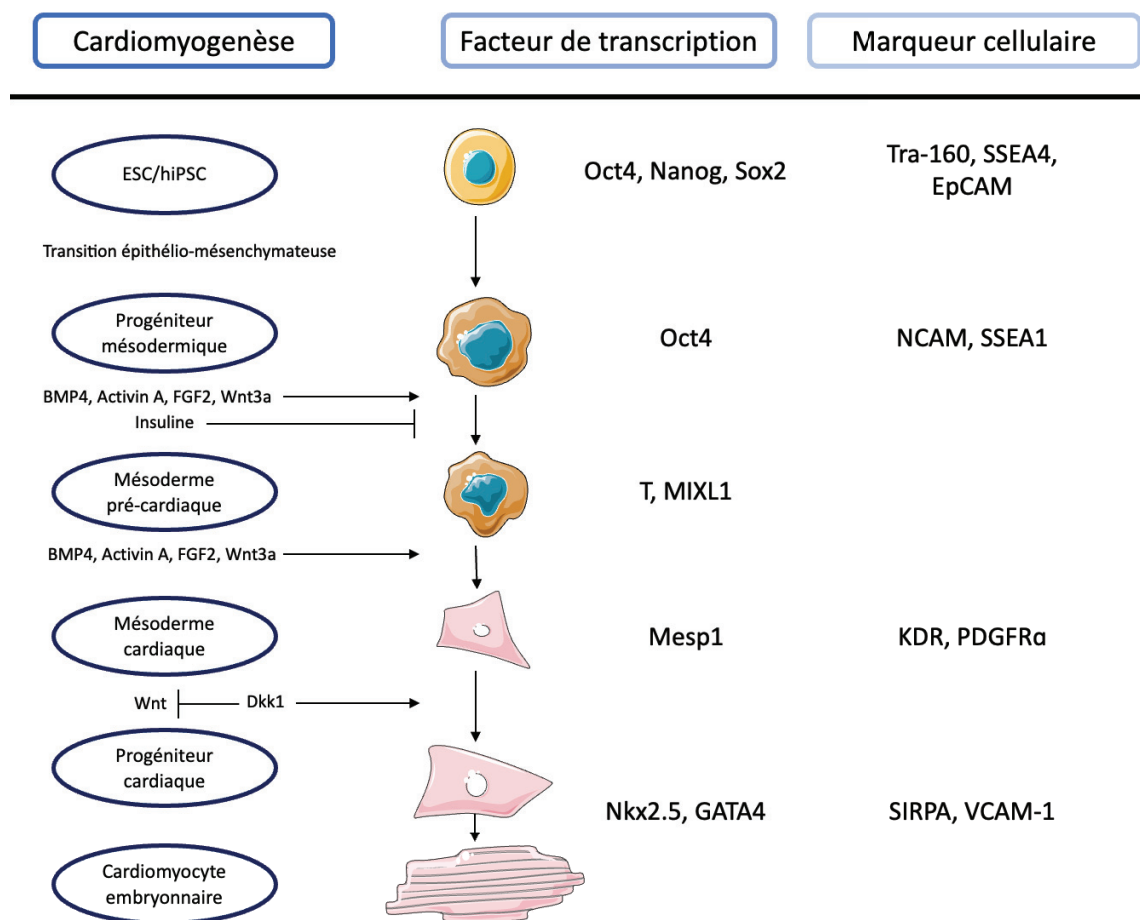


Figure 18 : Représentation schématique de la progression séquentielle de la Cardiomyogenèse à travers les voies de signalisation ainsi que les facteurs de transcription et les marqueurs de surface cellulaire associés

Les cellules souches ESC et iPSC passent d'abord par une étape de transition épithélio-mésenchymateuse afin d'induire le mésoderme. Les progéniteurs mésodermiques vont dériver en mésoderme cardiaque à la suite d'activateurs tels que le FGF2, Wnt, BMP4 ou activine A. Enfin le mésoderme cardiaque donne naissance au progéniteur cardiaque via l'activation par le Dkk1 et l'inhibition de la voie Wnt
D'après Mummery et al. 2012

b) Méthode de différenciation

Les premières méthodes de différenciations d'ESC ont permis de mettre en évidence et d'affiner les voies de signalisation utilisées pour induire la différenciation cardiaque (Kehat et al. 2001; C. Mummery et al. 2003; Laflamme et al. 2007). En effet, la première différenciation cardiaque a été réalisée à partir de ESC à partir de la méthode dite de corps embryoïdes (EB) (*Embryoid body* en anglais) (Doetschman et al. 1985). Cependant, ces premières différenciations avaient une efficacité assez faible où seulement 20 à 30% des cellules exprimaient la TnT (Kehat et al. 2001). Plus précisément, les EB sont des agrégats cellulaires tridimensionnels, qui vont mimer une partie du processus de développement qui se produit dans un embryon tel que la différenciation dérivée des trois couches germinales. Ainsi, une partie des EBs présentent des régions qui se contractent spontanément. La différenciation cardiaque, à l'aide de cette méthode se divise en deux étapes : Une phase précoce nécessitant l'utilisation de BMP4, FGF2 et activine A ; et dans une phase plus tardive, la voie Wnt est inhibée, supplémentée par l'ajout d'acide ascorbique et de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Lian et al. 2013; Weng et al. 2014; Karakikes et al. 2014). Cependant la taille et la morphologie des EB influencent grandement sur la production et la différenciation des EB. Ils existent maintenant plusieurs méthodes pour contrôler la taille des EB. L'utilisation de l'agrégation forcée, dans laquelle les ESC sont mises dans une plaque 96 puits puis agrégées par centrifugation ou l'utilisation de plaques spéciales appelées AggreWell, générant des micro-puits en forme de pyramides inversées (Burridge et al. 2007; Pesl et al. 2014). Les milieux des cultures ainsi que les cytokines utilisées varient entre les méthodes de différenciation, mais toutes reposent sur la modulation des voies du BMP, FGF2 et de la voie Wnt (Y. Lin and Chen 2008) Il a également été vu que l'utilisation d'une faible dose d'insuline dans des stades précoces, chez les EBs, améliorerait l'efficacité et la reproductibilité des différenciations (Freund et al. 2008). Cette méthode de différenciation présente plusieurs inconvénients comme l'efficacité, la reproductibilité, le temps consommé, elle reste la méthode principale dans un grand nombre de laboratoires pour générer des cardiomyocytes.

Un autre protocole de différenciation cardiaque repose sur une co-culture d'ESC avec des cellules endodermiques viscérales de souris (END2 pour *visceral endoderm-like cell line*). Ces dernières sont dérivées de cellules de carcinome embryonnaire de souris. Les auteurs ont remarqué que cette co-culture induit la formation de zones battantes au bout de 12 jours (C. Mummery et al. 2003). De plus, l'ajout d'acide ascorbique, de SB203580 (inhibiteur de la voie des MAP kinase) et de prostaglandine a amélioré la différenciation. Cependant le mécanisme

précis par lequel les cellules END2 induisent la différenciation cardiaque reste inconnu (C. Mummery et al. 2003). Il a été suggéré que les facteurs sécrétés par les END-2 permettaient d'induire la différenciation des ESC en cellules cardiaques. Ces facteurs font partie de la famille des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), des TGF β , des FGF ainsi que des protéines de la voie Wnt. Cette étude a permis l'élaboration d'autres protocoles de différenciation, ainsi que l'amélioration, en utilisant ces facteurs.

Pour induire la différenciation en monocouche ou *monolayer* en anglais, il faut pouvoir cultiver les hiPSC en gardant leur état de pluripotence puis ajouter séquentiellement la bonne combinaison de facteurs de croissance (C. L. Mummery et al. 2012). Cette différenciation 2D consiste à ensemercer des iPSC et attendre une confluence de 80-90% pour induire la différenciation cardiaque à l'aide de cytokine. Les premières tentatives de différenciation cardiaque en utilisant cette méthode ont été réalisées à partir d'ESC en modulant la voie Wnt/ β -caténine pour conduire les hiPSC vers la spécification mésodermique puis vers la différenciation cardiaque (Laflamme et al. 2007; Paige et al. 2010; Lian et al. 2013). Ces premières études ont démontré une temporalité d'action de cette voie de signalisation, comme illustrée plus haut dans la figure 18. En effet, il faut activer cette voie en début de différenciation pour induire les cellules en mésoderme cardiaque puis l'inhiber pour permettre la génération de progéniteurs cardiaques. Deux approches sont utilisées pour moduler la voie Wnt. La première est l'ajout de facteurs tels que l'activine A, BMP4 ou FGF2 et la deuxième l'utilisation de petites molécules telles que le CHIR99021 ou le Wnt-C59. Une étude en 2012 rapporte que ce protocole peut être amélioré par l'ajout d'une matrice cellulaire pendant la différenciation pour imiter au mieux la cardiomyogenèse. Cependant l'ajout de la matrice augmente également les coûts de la différenciation (J. Zhang et al. 2012). Le protocole de différenciation en monolayer génère une monocouche contractile avec une efficacité de différenciation qui varie entre 70 à 90% (BurrIDGE et al. 2014; Lian et al. 2013). La méthode en monocouche est plus facile à mettre en place que la méthode des EB. De plus le rôle bi-phasique de la voie canonique de Wnt a permis de mettre au point un protocole de différenciation robuste et d'obtenir des grandes quantités de cardiomyocytes dérivés d'iPSC (BurrIDGE et al. 2014). Ces méthodes de différenciation sont résumées dans la figure 19.

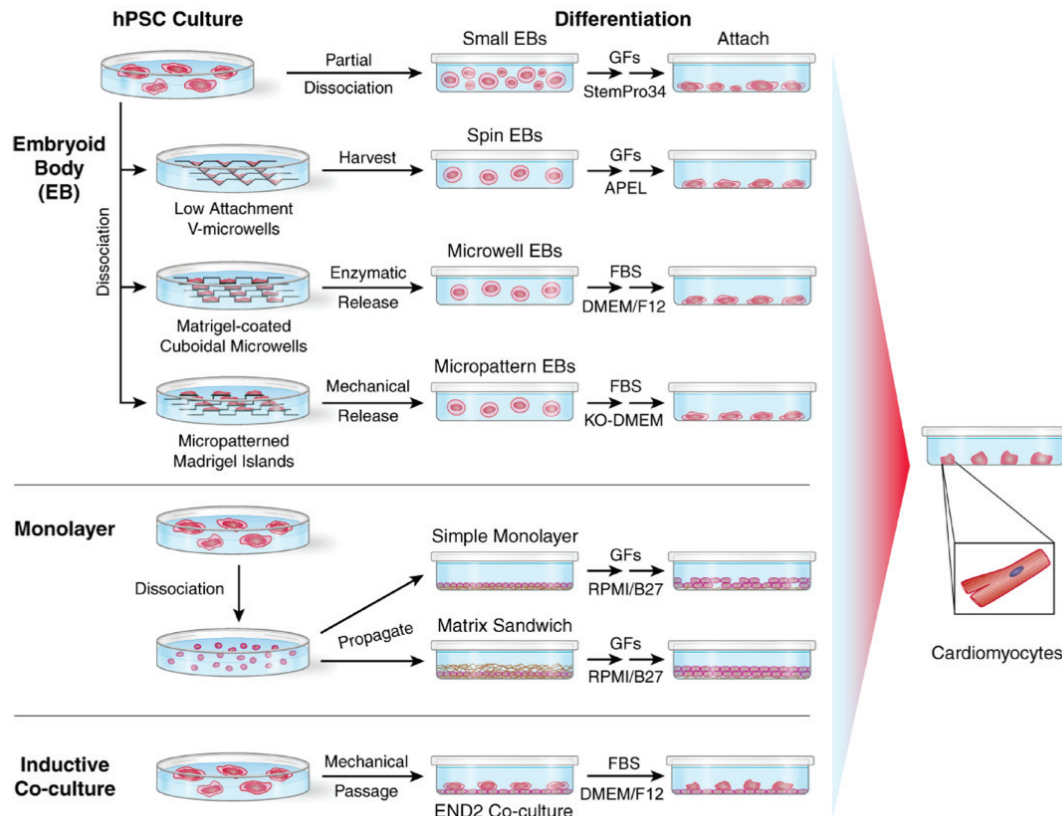


Figure 19 : Représentation des différentes méthodes de différenciation cardiaque à partir d'iPSC

La méthode de corps embryonide (EB) va d'une simple dissociation des colonies d'iPSC à diverses méthodes pour contrôler le nombre et la taille des EB. La méthode de culture en monocouche peut être réalisée sur des supports de Matrigel. Pour les méthodes des EB et monocouche, l'application de facteurs de croissance clés est requise pour une cardiogenèse optimale. Enfin, la co-culture d'iPSC avec des cellules END2 de type endodermique viscérale tire parti de la signalisation cellulaire des cellules END2 pour favoriser la cardiogenèse.

Mummary et al. 2012

c) Caractéristiques des hiPSC-CM

La différenciation des iPSCs en cardiomyocytes représente donc un modèle intéressant pour étudier finement une mutation d'un patient spécifique et qui contourne les problèmes éthiques. Comme pour tous les modèles en laboratoire, les hiPSC présentent des avantages et des inconvénients, illustrés dans le tableau 1. Tout d'abord les hiPSC-CM permettent de travailler sur un modèle cellulaire humain, afin de modéliser une pathologie et généralement spécifique d'une mutation provenant du patient. D'un point de vue morphologique et structurel, les hiPSC expriment toutes les protéines du sarcomère avec la présence de striations et de connexions intercellulaires (G. Jung and Bernstein 2014; Pioner et al. 2016). Cependant, la morphologie globale de la cellule est circulaire et non rectangulaire comme des cardiomyocytes

adultes. De plus, l'appareil contractile est assez immature avec une absence de tubules T (Kamakura et al. 2013; Lundy et al. 2013).

Caractéristique	Avantages et similarités	Inconvénients	Cardiomyocyte adulte
Morphologie	Striations	Forme circulaire	Forme rectangulaire
		Pas de Tubule T	Tubule T, Strie Z, bande M
	Protéines du sarcomère toutes présentes	Appareil contractile (AC) pauvre	AC fonctionnel (90% du volume cellulaire)
Métabolisme		Peu et mitochondrie immature Périnucléaire	Grand nombre de mitochondries le long de l'AC
		Energie générée par glycolyse	Energie générée à partir de la β -oxydation
Electrophysiologie	CICR fonctionnel	Contraction faible et spontanée	Forte contraction, non spontanée
	Courant principaux du PA: I_{Na} , I_{Ca} , I_{Kr} , I_{Ks} et I_{to}	Courant I_f	Courant $I_f \rightarrow$ cellules pacemaker
		Potentiel de Repos (PR) à -60mV	PR à -90mV
		Courant I_{Kr} faible	

Tableau 1 : Caractéristiques des cardiomyocytes issus d'iPSC et des cardiomyocytes humains adultes

Les cardiomyocytes dérivés des iPSC ont des caractéristiques communes avec des cardiomyocytes adultes mais diffèrent sur certains points par leur morphologie, leur métabolisme ainsi que leur électrophysiologie

D'un point de vue fonctionnel et électrophysiologique, les hiPSC-CM sont intéressantes dans l'étude des canalopathies car elles expriment la majorité des canaux ioniques avec notamment les courants principaux responsables du PA (I_{Na} , I_{Ca} , I_{Kr} , I_{Ks} et I_{to}) (Honda et al. 2011). L'expression de ces différents courants rend donc possible la modélisation pathologique au niveau électrophysiologique (Rajamohan et al. 2013). De plus, le CICR est fonctionnel chez ces cellules avec une compartimentation des stocks calciques intracellulaires (Itzhaki et al. 2011). En revanche, les hiPSC-CM battent spontanément à cause de la forte expression des canaux HCN responsables du courant I_f (J. Ma et al. 2011). De plus leur potentiel de repos est d'environ -60mV, comparé aux cardiomyocytes matures de -90mV, ceci est expliqué par un défaut en canaux potassiques rectifiants entrants de type 2.1 (Grant 2009).

Au niveau métabolique, les cardiomyocytes présentent un phénotype mitochondrial qualifié de fœtal. En effet les mitochondries de cardiomyocytes issus d'hiPSCs sont en faible nombre et localisé autour du noyau (Karbassi et al. 2020). L'énergie générée à partir de ces mitochondries

provient de la glycolyse. En comparaison, les mitochondries de cardiomyocytes adultes humains sont localisées le long de l'appareil contractile et l'énergie générée provient majoritairement de la β -oxydation des acides gras (Dai et al. 2017; Stanley, Recchia, and Lopaschuk 2005).

Enfin il a été montré que la différenciation cardiaque à partir d'hiPSC génère des cellules nodales, atriales et ventriculaires (J. Zhang et al. 2009). Les hiPSC-CM présentent donc des avantages mais des inconvénients liés à leur immaturité. Les laboratoires ont alors cherché des outils afin d'améliorer la maturité de ce modèle cellulaire et d'exploiter pleinement le potentiel de ces cellules. Ceci permet d'améliorer la comparaison entre le phénotype du patient et celui des hiPSCs.

Différentes méthodes ont permis d'améliorer la maturité des hiPSC-CM, illustrées dans la figure 20. Premièrement, une culture prolongée des hiPSC-CM permet d'obtenir significativement une maturité ainsi qu'un nombre de cellules positives à la MLC2v (*Myosin light chain 2 ventricular*) accrut (Lundy et al. 2013; Kamakura et al. 2013). L'utilisation de cytokines est également intéressante pour améliorer la maturité de cardiomyocytes issus d'iPSCs. En effet, l'IGF, le NRG1 ainsi que l'angiotensine II stimulent la croissance cellulaire, normalisant la taille des hiPSC-CM par rapport à des cardiomyocytes adultes (Wu et al. 2013; Laustsen et al. 2007; Odiete, Hill, and Sawyer 2012). Une autre approche biochimique consiste à forcer la maturation métabolique. Pour cela un milieu sans glucose peut être utilisé afin de forcer les hiPSC-CM à utiliser l'oxydation des acides gras, comme dans un cardiomyocyte humain mature. Une étude a d'ailleurs montré une amélioration de la maturité en utilisant cette méthode (Drawnel et al. 2014). L'utilisation de tri-iodothyronine (T3) peut également accélérer la maturation de la contractilité et du métabolisme (X. Yang et al. 2014). Il existe des méthodes de maturation dites physiques. Les hiPSC-CM présentent une immaturité électrique, cependant des études ont montré qu'une stimulation électrique et mécanique peuvent améliorer ces propriétés (Chan et al. 2013; Kroll et al. 2017). Il existe également des méthodes de culture 3D stimulant la maturité. En effet, l'EHT (pour *Engineered Heart-Tissue*) a des avantages en termes de reconstitution du myocarde adulte au niveau tissulaire (Zimmermann et al. 2002). Zimmerman et collaborateur ont été les premiers à développer cette méthode en mélangeant les cardiomyocytes issus d'iPSC avec des fibroblastes, le tout dans un hydrogel à base de collagène. Après la formation des EHT, ceux-ci sont étirés passivement. Cet étirement a entraîné une augmentation de l'expression des gènes codant pour la TnT, les canaux potassiques, les protéines associées au tubule T, mais aussi un alignement optimal et un développement des

tubules T (Abilez et al. 2018; Hirt, Hansen, and Eschenhagen 2014). Ces méthodes de maturation ont amélioré l'état structurel et fonctionnel des hiPSC-CM. Malgré cela le degré de maturité est encore insuffisant comparé à un cardiomyocyte adulte. La combinaison de ces différentes méthodes pourrait favoriser la maturation.

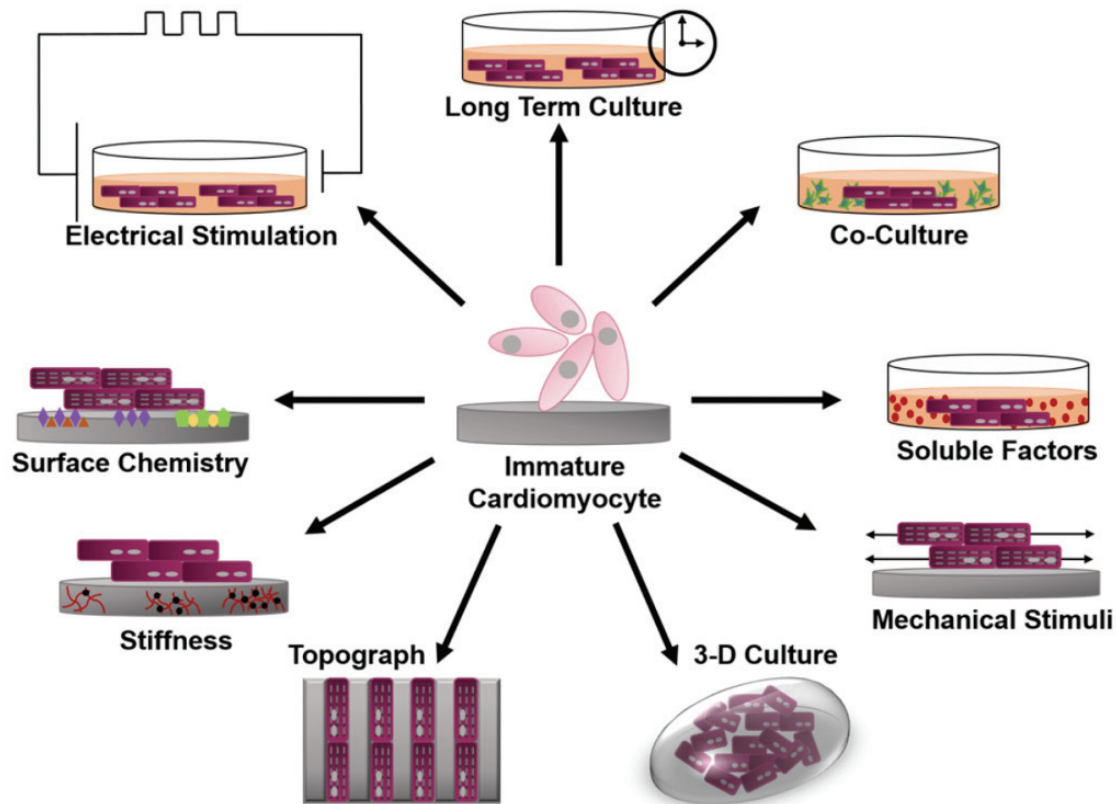


Figure 20 : Schéma des différentes techniques de maturation des hiPSC-CM

Différentes méthodes existent pour améliorer la maturité des cardiomyocytes issus d'iPSC. Une culture prolongée est efficace et améliore la maturité. Des méthodes chimiques sont utilisées pour améliorer cette maturité, comme l'utilisation de facteurs solubles ou une co-culture. Des méthodes physiques sont aussi efficaces en utilisant une stimulation électrique ou mécanique. Les cultures 3D sont aussi utilisées pour reproduire plus fidèlement une structure cardiaque

Besser et al. 2018

3. hiPSC-CM dans l'étude des troubles du rythme

La recherche sur les maladies cardiaques appliquées à l'Homme a toujours été limitée par la difficulté d'obtenir des échantillons. Les biopsies sont toujours très restreintes et très invasives pour le patient. Il est aussi possible d'obtenir des échantillons *post-mortem*, néanmoins, cela peut induire un biais expérimental évident. La capacité des iPSCs à se différencier en cardiomyocytes a considérablement amélioré les avancées sur la compréhension des pathologies cardiaques (Burridge et al. 2012). Ce modèle est le premier à permettre

d'étudier et de traiter une pathologie de manière spécifique à un patient et de comparer les résultats obtenus de manière intra- et extra-familiale. Une liste, non exhaustive, de l'utilisation des hiPSC-CM dans le cadre de modélisation pathologique est résumée dans le tableau 2.

Les iPSCs sont largement utilisées pour étudier les canalopathies, en raison de leur impact sur le PA (Fernández-Falgueras et al. 2017). La plus commune des canalopathies cardiaques est le syndrome du QT long, caractérisé par allongement de l'intervalle QT sur l'ECG. Ceci peut être dû à une mutation du canal sodique $Na_v1.5$ ou sur le canal potassique $K_v7.1$ ou $K_v11.1$ (Brewer et al. 2020). Moretti et collaborateurs sont les premiers à avoir développé des iPSCs pour étudier les syndromes du QT long (Moretti et al. 2010). A la suite de ces recherches, différents laboratoires ont étudié ce syndrome sur plusieurs mutations des canaux potassiques et sodiques et démontrant également une sensibilité accrue aux catécholamines (Wuriyanghai et al. 2018; van den Boogaard et al. 2019; Malan et al. 2016).

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (*catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia* (CPVT) en anglais) est une autre canalopathie d'origine génétique. Elle est généralement causée par une mutation du RYR2 (Leenhardt, Denjoy, and Guicheney 2012). En 2012, une première étude a permis de caractériser électrophysiologiquement la CPVT à partir d'iPSC du patient (Itzhaki et al. 2012). De nouvelles molécules ont ensuite été testées, en utilisant le modèle iPSC, afin de réduire les aberrations calciques dans la CPVT (C. B. Jung et al. 2012; Di Pasquale et al. 2013). De plus, suite au développement de la technologie CRISPR/CAS9 (pour *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) une étude a permis d'étudier de manière très fine une mutation provenant du patient et de la corriger sur les iPSCs à l'aide de cette technologie (Sleiman et al. 2020).

Les cardiomyopathies structurelles sont également étudiées à l'aide des iPSCs. Parmi ces cardiomyopathies, la plus commune est la cardiomyopathie hypertrophique (Roma-Rodrigues and Fernandes 2014). Cette cardiomyopathie est généralement due à une mutation sur un gène du sarcomère. Dans 70% le gène impliqué est le gène codant pour la chaîne lourde de myosine 7 (MYH7 pour *myosin heavy chain*) ou une protéine de liaison à la myosine (MYBPC3 pour *myosin-binding protein*) (Maron and Maron 2013). Dans le cadre des iPSCs plusieurs lignées ont été générées afin d'étudier cette pathologie de manière patient et mutation spécifique. Ces modèles ont permis de récapituler les principales caractéristiques de cette pathologie comme une désorganisation du sarcomère et un défaut dans les dynamiques calciques (Ojala et al. 2016; Lan et al. 2013). Ce modèle *in-vitro* a permis de mieux modéliser cette pathologie et d'apporter de nouvelles opportunités thérapeutiques comme l'utilisation

d'adénovirus pour corriger l'aberration génétique dans cette cardiomyopathie (Kohama et al. 2020).

La cardiomyopathie dilatée est également une cardiomyopathie structurelle liée à une mutation sur un gène sarcomérique, notamment la titine dans 25% des cas (Hinson et al. 2015). Une étude a généré des iPSCs à partir de patients portant une mutation sur ce gène, récapitulant les aspects morphologiques et fonctionnels. Ces cellules ont permis de démontrer que la mutation cause un défaut de contractilité lié à une altération de la régulation du myofilament ainsi qu'un défaut calcique (Sun et al. 2012).

Pathologie	Syndrome	Gène muté	highlight	Références
Canalopathie	QT long	KCNQ1	Récapitule les désordres électrophysiologiques	Moretti et al. 2010, Wuriyanghai et al. 2018
		KCNH2		Van den Boogard et al. 2019
		SCN5A	Test de drogues, améliorer les traitements	Malan et al. 2016
	CPVT	RYR2	Modélisation pathologique	Di Pasquale et al. 2013, Itzhaki et al. 2012
			Dantrolène réduit les sparks calciques	Jung et al. 2012
			CRISPR-Cas9 corrige la pathologie	Sleiman et al. 2020
Cardiomyopathie structurelle	Cardiomyopathie hypertrophique	MYBPC3	Modélisation pathologique	Ojala et al. 2016
		MYH7	Dérégulation calcique intracellulaire Vérapamile corrige ces défauts	Lan et al. 2013
		MYL2	CRISPR-Cas9 corrige la pathologie	Kohama et al. 2013
	Cardiomyopathie dilatée	TnT	Modélisation pathologique Inhibiteur β -adrénergique et suppression de la SERCA rétablit les défauts contractiles	Sun et al. 2012
	Dystrophie de Duchenne	Dystrophine	Modélisation pathologique CRISPR-Cas9 corrige la pathologie	Long et al. 2018
	Cardiomyopathie arythmogène	PKP2 DSG2	Transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes Accumulation lipidique	Caspi et al. 2013, Ma et al. 2013
			Surexpression de PPAR γ	Kim et al. 2013, Wen et al. 2015
			Défaut électrophysiologique	El- Battrawy et al. 2018, Khudiakov et al. 2020

Tableau 2 : Récapitulatif de différentes études utilisant les hiPSC-CM dans le cadre de pathologie cardiaque

Les cardiomyocytes dérivés des iPSC sont maintenant largement utilisés dans la modélisation et la compréhension de certaines pathologies cardiaques tels que les canalopathies et les cardiomyopathies structurelles

La dystrophie myotonique de Duchenne (DMD) induit un stress mécanique et une cardiomyopathie dus à un défaut de la protéine dystrophine (Fayssol et al. 2010). Les problèmes éthiques limitent les études sur la DMD et de plus en plus d'études utilisent des iPSC pour étudier cette pathologie. Les études utilisant des iPSCs dans le cadre de la DMD ont démontré un flux calcique intracellulaire aberrant, un stress mécanique, une forte apoptose liée à des défauts mitochondriaux et une production anormale de ROS (*Reactive Oxygen Species*). La technologie CRISPR/CAS9 a permis de rétablir une contractilité des cardiomyocytes (Long et al. 2018).

La CA est largement étudiée en utilisant des iPSCs, puisque ce modèle récapitule les principales caractéristiques de la pathologie (Elena Sommariva et al. 2017). D'un point de vue morphologique, plusieurs études démontrent l'apparition de gouttelettes lipidiques, caractéristiques d'une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes, chez des iPSCs (Caspi et al. 2013; D. Ma et al. 2013). En effet, la technique de *Oil Red O*, marquant les lipides, révèle une augmentation du nombre de ces gouttelettes chez les iPSC-CMs de patients (D. Ma et al. 2013). Une autre étude a également défini une augmentation du nombre de clusters lipidiques en lien avec une distorsion des desmosomes (Caspi et al. 2013). Ceci récapitule une transformation morphologique des cardiomyocytes en adipocytes à l'aide des iPSCs. De plus, Kim et collaborateurs ont démontré une localisation de la Pkg au niveau du noyau avec une faible activité de la β -caténine (Kim et al. 2013). En plus de ces observations, il a été décrit qu'une augmentation spontanée anormale du gène PPAR γ , mais également une stimulation par la rosiglitazone et l'indométacine, induit une lipogenèse et une apoptose accrue des cardiomyocytes, alors que son inhibition prévient ces troubles morphologiques (Kim et al. 2013; Wen et al. 2015). Pour récapituler, l'utilisation des iPSCs a permis d'identifier une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes liée à l'activation anormale du gène PPAR γ dans la CA (Caspi et al. 2013; D. Ma et al. 2013; Kim et al. 2013; Wen et al. 2015). Outre les changements morphologiques, les études sur les iPSCs révèlent également un remodelage électrophysiologique. En effet, la technique de patch-clamp, réalisée sur hiPSC-CM, a démontré une amplitude et une vitesse d'ascension du potentiel d'action plus faibles que le contrôle hiPSC-CM. Ces réductions résultaient d'une diminution du courant sodique dans la CA (Wen et al. 2015; El-Battrawy et al. 2018). De plus, bien qu'ils aient observé une augmentation du courant potassique (I_{Kf}), aucune différence sur l'APD n'a été rapportée. Cela pourrait être dû à une réduction de I_{NCX} , I_{to} , I_{SK} et I_{KATP} . Cela pourrait également dépendre du stade de développement des hiPSC-CM ou de l'hétérogénéité de leur âge de différenciation lors de l'étude. Cependant les hiPSC-CM de patients étaient plus sensibles à la stimulation

adrénergique. En effet l'isoprénaline raccourcit l'APD et l'épinéphrine déclenche plus d'événements arythmogènes, tels que des EADs et DADs, chez ce modèle d'hiPSC-CM de CA (El-Battrawy et al. 2018). Une publication récente a démontré le lien entre les courants sodiques et l'activité Wnt/ β -caténine chez les hiPSC-CM portant une mutation sur le gène codant pour la PKP2. La mutation PKP2 a induit une réduction significative de l'activité Wnt et de la densité I_{Na} , qui sont restaurées par inhibition de GSK3 β (Khudiakov et al. 2020). Les iPSCs ont permis une approche plus centrée sur la cellule et ont permis de mettre en évidence une plus grande importance de l'origine myogénique. En effet, les arythmies ne reposent pas seulement sur un changement morphologique du cœur, induisant des troubles de conduction, mais sont également dues à une profonde modification du profil électrique de la cellule.

B. Objectif de travail

La CA est une pathologie progressive perturbant le fonctionnement cardiaque. C'est une maladie grave, car elle peut entraîner des arythmies à l'origine de morts subites cardiaques chez les patients. Les atteintes dans cette pathologie se caractérisent par deux aspects : (i) un remodelage morphologique avec une apparition fibro-adipeuse et, (ii) un remodelage électrophysiologique. Ces deux aspects sont importants dans l'aggravation de la pathologie. Les études portant sur la compréhension des mécanismes qui interviennent dans cette pathologie constituent un enjeu de santé publique. Les cardiomyocytes issus d'hiPSC se sont révélés être un outil cellulaire intéressant pour modéliser des pathologies cardiaques héréditaires. L'objectif principal est de mieux comprendre les mécanismes fonctionnels et moléculaires de la CA *via* l'utilisation des hiPSCs. Notre étude porte sur un patient diagnostiqué positif à la CA et présentant une mutation faux sens (c.394C>T) sur le gène codant pour la protéine DSC2. Nous avons divisé le travail de thèse en différents objectifs.

Le premier objectif de l'étude était d'observer l'ultrastructure des hiPSC-CM contrôle et spécifiques d'un patient à partir de la MET. La microscopie électronique à transmission (MET) est idéale pour comparer l'ultrastructure des cellules contrôles avec celle des cellules issues d'un patient (avec une mutation pour la protéine DSC2) afin de valider notre modèle d'un point de vue structural, ainsi que de valider notre hypothèse de transdifférenciation. En effet, dans la littérature, la transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes se manifeste par une accumulation lipidique au sein de la cellule cardiaque. Ces expériences sont importantes avant d'étudier les mécanismes fonctionnels de la transdifférenciation.

Le deuxième objectif de l'étude était d'apporter un éclaircissement sur la caractérisation fonctionnelle du modèle. En effet, peu d'études se sont focalisées sur la caractérisation électrophysiologique des hiPSC-CM à partir de patients atteints de CA et encore moins concernant une mutation sur le gène DSC2. Les molécules anti-arythmiques sont encore faiblement utilisées pour prévenir les arythmies dans le cadre de la CA. C'est pourquoi nous allons également tester différentes molécules afin d'améliorer notre compréhension sur l'action de ces substances *in-vitro* sur les cellules provenant du patient.

Le troisième objectif du travail était d'étudier la pathogenèse et notamment l'effet d'une voie de signalisation particulière, ce qui induit une modification d'expression des gènes entraînant une perturbation fonctionnelle et un changement de l'identité cellulaire. En effet, dans le cadre de la CA, la Pkg n'est plus confinée à la membrane et elle entre alors en compétition avec la β -caténine, inhibant ainsi la voie Wnt. De plus, des études ont montré que l'inhibition de cette voie entraîne une surexpression de la voie PPAR γ , qui est d'ailleurs

fortement impliquée dans les processus d'adipo- et lipo-genèse. Des études stimulent cette voie pour observer une accumulation lipidique plus importante dans leur modèle. La voie de signalisation PPAR γ semble être une voie centrale dans la compréhension de la pathogenèse de la CA. Nous avons comme objectif d'étudier le rôle de cette voie en particulier d'un point de vue électrophysiologique. Ce dernier point a rarement été rapporté dans la littérature et cet aspect est tout particulièrement important, car la transdifférenciation pourrait ne pas impliquer seulement un remodelage morphologique et structural mais également des modifications électrophysiologiques directes, indépendants du remodelage fibro-lipidique.

Le quatrième objectif du travail était d'étudier une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement de la CA. En effet, une nouvelle étude clinique de phase II utilisant la spironolactone a débuté chez une cohorte de patients atteints de la CA. La spironolactone est un diurétique inhibant le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA). Des études sur l'insuffisance cardiaque congestive ont démontré qu'une activation prolongée du système RAA provoque un remodelage fibrotique du cœur. Cette étude clinique va s'intéresser aux effets globaux et notamment systémique du système RAA dans le cadre de la CA. Cependant, les effets cellulaires et moléculaires sur des cardiomyocytes sont mal connus. Le but est donc de révéler les effets de la spironolactone, notamment fonctionnels, à partir d'hiPSC-CM mutés pour la DSC2.

C. Méthodologie

I. Modèle Expérimental

1. Les cardiomyocytes issus d'hiPSC

a) Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires d'hiPSC ont été utilisées dans le cadre de nos études sur la CA. Nous disposons de deux clones d'hiPSC issus du même patient. Les iPSC proviennent de fibroblastes cutanés et ont été reprogrammées et caractérisées par Phenocell (Evry, France). Cette société a utilisé une transfection de 5 facteurs de reprogrammation tels que Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc et Lin28, à l'aide du milieu de culture STEMACS IPS Brew-XF. Nous disposons également deux lignes contrôles provenant de 2 sujets sains, de sexe masculin, pour comparer nos résultats. Ces lignées proviennent de la plateforme iPS_INMG (Institut Neuromyogène de Lyon) ainsi que de I-Stem (Institut I-Stem d'Evry).

Toutes les cellules utilisées ont subi une procédure de validation par des marqueurs de pluripotence et du potentiel de différenciation. Les échantillons biologiques ont été manipulés conformément aux déclarations d'Helsinki avec le consentement des patients/sujets et approuvés par un comité d'éthique.

Nomenclature	Origine
Lignée contrôle 1 : AG08C5	iPS_INMG
Lignée contrôle 2 : FSC03	I-Stem
Lignée mutée 1 : 72C6 mutation DSC2 c.394C>T	Même patient admis à l'Hôpital de Lyon
Lignée mutée 2 : 72C8 mutation DSC2 c.394C>T	Reprogrammée par Phenocell

Tableau 3 : Récapitulatif de l'origine ainsi que la nomenclature des lignées d'hiPSCs

b) Culture et différenciation des hiPSC en cardiomyocytes

La différenciation des hiPSC en cardiomyocytes se fait à l'aide de la méthode de sandwich 2D en monocouche. Cette méthode est connue et a déjà été publiée (Burridge et al. 2014). Les hiPSC sont cultivés sur un Matrigel™ adapté à la culture de cellules souches (Corning). Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu spécifique le StemFlex™ (ThermoFisher Scientific) et en condition standard dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à atteindre une confluence de 80-90% où elles sont par la suite dissociées à l'aide de TrypLETMExpress (thermoFisher Scientific). Après dissociation les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque 6 puits, préalablement « coatées » (recouvertes) avec du Matrigel, à 30 000 ou 50 000 cellules/cm². Après 4 jours, où une confluence de 90% est obtenue dans chaque puits, le protocole de différenciation est lancé où différentes étapes sont obligatoires et nécessaires pour obtenir des cardiomyocytes.

- La première étape consiste à ajouter 0,04 mg/mL de Matrigel réduit en facteur de croissance (MgFr ; *Matrigel growth factor reduced* en anglais). Cette étape est ce que l'on appelle le J-1 et permet de préparer les hiPSC pour la différenciation.
- Le processus de différenciation est ensuite initié avec du milieu RPMI1640 (ThermoFisher Scientific) avec du supplément B27 moins insuline (1X) et du MgFr à la même concentration que le J-1. Un activateur de la voie de signalisation Wnt, le CHIR99021 (LC Laboratories) est ajouté à 6 µM au milieu de culture. Ceci constitue l'étape J0 et ce milieu est gardé pendant 2 jours.
- L'étape suivante, le J2, le milieu est changé avec du RPMI1640 B27 moins insuline.
- Le lendemain, l'étape J3 est effectuée en ajoutant au RPMI1640 un inhibiteur de la voie Wnt, le Wnt-C59 (LC Laboratories) à 2 µM. Ce milieu est gardé 2 jours.
- A J5 et J7, le milieu de culture est remplacé par du RPMI1640 B27 moins insuline.
- Au jour 9 après le début de la différenciation cardiaque, le milieu est changé pour du RPMI1640 B27 plus insuline. A cette étape les premières contractions sont observées et le milieu est renouvelé tous les 2 jours jusqu'à être prête pour les expérimentations à J60. Le temps de culture des hiPSC-CM est allongé jusqu'à 60 jours afin d'avoir un taux de maturation suffisant pour que les cellules puissent exprimer les phénotypes caractéristiques des conditions contrôles et mutées DSC2.

II. Caractérisation génétique des hiPSC-CM

1. Dissociation enzymatique des hiPSC-CM

Afin de réaliser les expériences de biologie moléculaire, les puits comprenant le meilleur taux de différenciation (efficacité de différenciation estimée visuellement entre 80-100%) sont sélectionnés et dissociés pour former des culots secs. Cette étape s'effectue à 60 jours après le début du protocole de différenciation. Les monocouches de cellules sont rincées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS : *Phosphate Buffer Saline* en anglais) et dépourvue de calcium, afin de fragiliser les connexions intercellulaires. Cette étape de rinçage est importante pour évacuer les protéines présentes dans le milieu de culture et qui pourraient diminuer l'efficacité de la dissociation enzymatique. Comme pour les hiPSC, les cellules sont ensuite incubées avec du TrypLETMExpress pendant 10 minutes afin de faciliter le décollement des cellules. L'action de l'enzyme est bloquée par dilution : ajout du milieu de culture RPMI1640 B27 plus insuline. Après cette étape de dissociation enzymatique, une étape de dissociation mécanique est effectuée à l'aide d'une micropipette P1000. Tout le contenu du puit est enfin centrifugé dans 10 mL total de milieu afin d'obtenir un premier culot. Cette première centrifugation permet également de se débarrasser des débris et des résidus de milieu de culture. Ce culot est transféré dans du PBS puis de nouveau centrifugé. Après cette deuxième centrifugation, tout le PBS est retiré et le culot, toujours attaché à l'eppendorf 1.5 mL est plongé dans de l'azote liquide afin de congeler les cellules et maintenir l'intégrité de leurs composants. Les culots secs ainsi obtenus sont conservés au congélateur à -80°C.

2. RT qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reactions

a) Extraction d'ARN

L'extraction de l'ARN (Acide Ribonucléique) est une étape préalable avant de réaliser la RT-qPCR. L'ARN est extrait à l'aide du kit Direct-ZolTM RNA Miniprep (Zymo Research, Ozyme) en suivant le protocole fournis par le fabricant. La totalité des étapes sont effectués sur glace à 4°C afin de minimiser la dégradation de l'ARN.

- Les culots secs sont dissociés, homogénéisés et lysés en ajoutant 1mL de TRIzol®. L'échantillon est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 secondes pour retirer les débris. Le surnageant est transféré dans un nouveau eppendorf 2.0 mL.

- Après cette étape, un volume équivalent d'éthanol à 100 % est ajouté, c'est-à-dire 1 mL. Après une homogénéisation le mélange est transféré dans une colonne Zymo-Spin™ muni d'un tube collecteur. Une centrifugation à 10 000 g pendant 30 secondes est réalisée et le contenu du tube collecteur est jeté. Cette étape de transfert peut se faire en plusieurs fois, car le volume maximal de la colonne est de 700 µL.
- Il est recommandé d'effectuer un traitement à la DNase après l'étape précédente, afin de diminuer l'éventuelle contamination à l'ADN génomique à la fin de l'extraction et de fausser les résultats finals. Pour cela 400 µL de RNA Wash Buffer est ajouté à la colonne avec 80 µL de DNase.
- Après 15 minutes d'incubation, 400 µL de Direct-zol™ RNA PreWash est ajouté à la colonne. Une centrifugation à 10 000 g pendant 30 secondes est réalisée et le contenu du tube collecteur est jeté.
- 700 µL de tampon de RNA Wash Buffer est ajouté à la colonne et une centrifugation à 10 000 g pendant 2 minutes est réalisée afin de retirer complètement le tampon de lavage.
- La colonne est ensuite transférée sur un tube vierge sans RNase.
- 30 µL de DNase/RNase-Free Water est ajouté directement sur la matrice de la colonne et une centrifugation à 10 000 g pendant 30 secondes est réalisé pour éluer l'ARN dans le tube.
- Les ARN sont dosés à l'aide d'un NanoDrop One (ThermoFisher Scientific). L'ARN est fragile et instable, il est donc important de les conserver soigneusement à -80°C.

Il est important de vérifier la pureté de l'ARN par les ratios $A_{260/280}$ et $A_{260/230}$. Ces ratios reposent sur la loi de Beer-Lambert où $A = \epsilon \cdot l \cdot c$. A étant l'absorbance sans unité, ϵ le coefficient d'absorption moléculaire, l la longueur du trajet optique et C la concentration en acide nucléique. Cette formule permet de connaître aisément une concentration en acide nucléique au Nanodrop. Ces ratios d'absorption permettent donc de déterminer la quantité d'ARN extrait et une potentielle contamination. Un ratio $A_{260/280}$ compris entre 1,80 et 2,0 indique que l'échantillon est pur en ARN, cependant une valeur plus faible indiquerait que l'extraction est

polluée par des protéines ou des composants phénoliques. Un ratio $A_{260/230}$ est compris entre 2.0 et 2.2, si ce ratio est plus faible cela indique aux solvants, sels et autres contaminants organiques.

b) Reverse Transcriptase RT

Le kit *Transcriptor Universal ADNc Master* (Roche) est utilisé afin de procéder à la rétro transcription (RT) : il s'agit de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Ce kit comprend un tampon buffer à 5X et de l'enzyme de conversion. Il faut au préalable réaliser le mix avec 1 μ L d'enzyme de conversion et 4 μ L de tampon. Les RT sont réalisés avec 500 ng d'ARN. Après avoir réalisé les dilutions dans un volume total de 15 μ L d'ARN à la concentration souhaitée, le mix comprenant l'enzyme de conversion est ajouté puis les tubes sont insérés dans Thermal Cycler 512 (TC 512) (38 minutes à 60°C). Le TC 512 à l'aide du kit va permettre de convertir l'ARN en ADNc. Une fois l'étape de RT terminée, il faut ajouter un 180 μ L d' H_2O stérile aux ADNc.

c) La PCR quantitative

La PCR consiste à amplifier l'ADNc d'un gène donné à l'aide d'amorces spécifiques de ce dernier afin de rendre sa détection possible. Dans notre cas, l'ADN a été amplifié par le LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). La détection de chaque ADN a été réalisée en triplicat technique réalisée sur 5 échantillons différents. Le gène ribosomale 60S P0 (RPLP0) est utilisé comme gène de référence, car c'est un gène ubiquitaire et son expression ne varie pas entre chaque lignée cellulaire. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel LightCycler 480. Les gènes avec un seuil de cycle (C_t) supérieur à 35 ont été considérés comme indétectables. L'amplification de chaque gène se fait à l'aide de plaques 96 puits (LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche)). Chaque puit de la plaque contient 5 μ L de LightCycler 480 SYBR Green I Master, 1 μ L du mix d'amorces d'intérêts du gènes, 1,5 μ L d' H_2O et 2,5 μ L d'ADNc d'intérêt. Les valeurs de C_t sont calculées en normalisant la valeur moyenne de chaque gène par rapport à la valeur moyenne du gène de référence. Dans cette étude le gène de chaîne légère de myosine a été utilisé comme marqueur cardiaque. Des gènes codants pour des canaux ioniques ont également été étudiés tels que le $Na_v1.5$, le $K_v7.1$, $K_v11.1$ et le RYR. Le gène codant pour le PPAR γ et deux gènes cibles de sa voie de signalisation tels que le gène à l'adiponectine et la

périlipine a été amplifié comme marqueur pro-adipogénique. Les gènes utilisés dans cette étude ainsi que les amorces sont répertoriés dans le tableau 4.

Target gene	Accession numbers	Gene description	Primer Sequence (5'-3')	Size (pb)
RPLP0	NM_001002.4	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0	Forward: AGCAAGTGGGAAGGT Reverse: TCATCCAGCAGGTGT	114
PPAR γ	NM_015869.5	Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ	Forward: CGAAGACATTCCATTACAAGAAC Reverse: CTGTCATCTAATTCAGTGCATTG	120
ADIPOQ	NM_004797.4	Adiponectin	Forward: GAGAAGGGTGAGAAAGGAGAT Reverse: TCATTATCAGCATAGAGTCCATTACG	114
PLIN2	NM_001122.4	Perilipin 2	Forward: GCTTCACTCCCGTGCCTA Reverse: GCATTGCGGAACACTGAGTA	103
MYL2	NM_000432.4	Myosin light chain 2	Forward: CCAGAACAGGGATGGCTT Reverse: TCCTAGTCCTTCTTCTCCG	91
KCNQ1	NM_000218.3	K $_v$ 7.1 (I $_{Ks}$)	Forward: CTCACCTATTGACCGCA Reverse: TCTTACCACCACAGACTTCTTG	143
KCNH2	NM_000238.4	K $_v$ 11.1 (I $_{Kr}$)	Forward: GGAGCCTCTGAACCTGTATG Reverse: GACTGAAGCCACCCTCTAAC	230
SCN5A	NM_000335.5	Na $_v$ 1.5 (I $_{Na}$)	Forward: GTGAACAACAAGAGCCAGTG Reverse: TGCATACATAATGTCCATCCAGC	127
RYR2	NM_001035.3	Ryanodine Receptor 2	Forward: AATTGAGACGGTCA Reverse: TTGCCAAGAGCGCCC	132

Tableau 4 : Résumé des gènes évalués dans cette étude. Gène cible, numéros d'accension, description du gène, amorce et tailles de produit

III. Caractérisation électrophysiologique des hiPSC-CM

1. Le patch clamp

La technique de patch clamp consiste à enregistrer des courants électriques générés par l'ouverture de canaux ioniques présents à la membrane cellulaire. Ceci est rendu possible par l'accolement d'une micropipette en verre, munie d'une électrode et contenant une solution conductrice, à la membrane de la cellule. Ce contact étroit et étanche est appelé *seal*. A l'aide de légères succions, la résistance caractérisant le contact cellule-pipette est augmentée jusqu'à atteindre le *gigaseal*. La forte stabilité mécanique qui en résulte fait que la paroi de la pipette devient une forte barrière de diffusion d'ions. Il existe différentes configurations selon l'étude biophysique du canal que l'expérimentateur souhaite réaliser et du mode de contrôle par des messagers chimiques. Pour ce projet, la configuration cellule entière ou « *whole cell* » est utilisée pour l'enregistrement de potentiel d'action et de courants ioniques tels que les courants sodiques, calciques et potassiques. Celui-ci est obtenu par rupture de la membrane plasmique de la cellule. Le milieu conducteur présent dans la pipette peut alors diffuser à l'intérieur de la cellule et ainsi contrôler le milieu intracellulaire. Il est alors possible de mesurer l'ensemble des propriétés électriques de la membrane cellulaire.

a) Matériel

Les micropipettes sont réalisées à l'aide d'une étireuse (*Sutter Instruments P-97*) à partir de tubes à micro-hématocrites (*Vitrex*). La résistance des pipettes varie entre 1 et 2 M Ω , une fois remplie par le milieu intrapipette. L'acquisition des courants électriques est réalisée par un amplificateur de type Axopatch 200B (*Axon Instruments*) à température ambiante.

Concernant le modèle cellulaire, les hiPSC-CM sont dissociées à J53 et réensemencées dans des pétris de 40 mm de diamètre à une concentration de 400 000 cellules par pétri. Les expériences sont réalisées à J60 soit 7 jours après la dissociation et à température ambiante.

b) Enregistrement des PA

L'enregistrement des PA est réalisé en stimulant les cellules par un courant de 20-1500 pA pendant 3 ms à différentes fréquences (1, 0,5 et 2 Hz). La solution intrapipette contient 10 NaCl, 122 KCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA et 10 HEPES (en mmol/L) avec un pH ajusté à 7,3 à l'aide de KOH. La solution de bain est composée de 145 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 8 Glucose et 10 HEPES avec un pH ajusté à 7,4 par du NaOH (mmol/L). Les cellules sont maintenues

artificiellement à -80 mV. L'analyse des PA est effectuée sur le logiciel *Clampfit* et différents paramètres sont analysés tels que la durée du potentiel d'action à 90, 50, 30% de repolarisation (APD₉₀, APD₅₀, APD₃₀) et la vitesse d'ascension maximale du PA (dv/dt_{\max}).

c) Enregistrement des courants sodiques

Les courbes courants/potentiels et d'activation des courants sodiques sont enregistrées en stimulant les cellules par des échelons dépolarisants (*pulses*), avec des incréments de 5 mV, d'une durée de 50 ms allant de -90 à +45 mV depuis un potentiel de maintien de -100 mV. La courbe d'inactivation est réalisée à l'aide d'une pré-dépolarisation (*prépulse*) de 500 ms, avec des incréments de +5 mV allant de -100 mV à -40 mV, suivis d'un pulse de 4 ms à -30 mV. Pour l'enregistrement des courants, les pipettes ont été préalablement *coatées* avec de l'HIPEC (Dow-Corning) afin de diminuer les capacitances de l'électrode. La solution intrapipette contient 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, and 10 HEPES avec un pH ajusté à 7.4 à l'aide de CsOH (mmol/L). La solution de bain est composée de 105 NMDG, 35 NaCl, 2 KCl, 1,5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 Glucose, 10 Hepes 10 TEA-Cl et 0,5 Nimodipine avec un pH ajusté à 7,4 en utilisant de l'acide méthaneethiosulfonic. Les courants sodiques sont filtrés à 5 kHz et digitalisés à 10 kHz. Les courbes courants/potentiels, d'activation et d'inactivation sont obtenus et analysés sur *Clampfit*.

d) Enregistrement des courants calciques

Les courbes courants/potentiels et d'activation des courants calciques sont obtenues en stimulant les cellules par des pulses de 200 ms, avec des incréments de 5 mV, allant de -80 mV jusqu'à +40 mV. L'enregistrement des courants se fait via le baryum (Ba²⁺), un cation divalent perméant via les canaux calciques, afin de s'affranchir de l'activation calcium-dépendante. La solution intrapipette contient 35 CsCl, 100 CsF, 5 Na₂ATP, 10 EGTA et 10 HEPES (mmol/L) avec un pH ajusté à l'aide de KOH à 7.4. La solution de bain contient 140 TEA-Cl, 2 KCl, 2,5 BaCl₂, 2 MgCl₂, 10 Glucose et 10 HEPES (mmol/L) avec un pH ajusté à 7,4 avec du KOH. L'analyse des courants est réalisée sur le logiciel *Clampfit*.

e) Enregistrement des courants potassiques

L'enregistrement des courants potassiques est réalisé par des pulses de 4 secondes, avec des incréments de 5 mV, allant de -80 à +40 mV. Les solutions utilisées sont les mêmes que

celles utilisées pour l'enregistrement des PA. L'analyse et les courbes courants/potentiels sont réalisées sur le logiciel Clampfit.

2. Imagerie calcique

L'imagerie calcique est réalisée sur les hiPSC-CM afin d'étudier la dynamique de la signalisation calcique intracellulaire. Cette technique permet de visualiser les cinétiques de variations spontanées de Ca^{2+} intracellulaire et également les événements Ca^{2+} aberrants (*sparks*). La sonde calcique utilisée pour cette expérience est la Fluo4-AM (ThermoFischer). C'est une sonde excitable à une longueur d'onde de 494 nm et émet à une longueur d'onde de 506 nm. Il s'agit d'une sonde non ratiométrique, mais très sensible avec une constante de dissociation (Kd) de 345 nm, permettant l'enregistrement de rapide et bref changement de calcium cytoplasmique (Gee et al. 2000). Le groupement AM est un groupe ester acétométhylque, permettant de rentrer dans la cellule. Ce groupement est ensuite clivé par des estérases endogènes dans le cytosol, la sonde peut alors se lier aux ions Ca^{2+} . Cette sonde est conservée dans du DMSO à -20 °C.

Les cellules, comme pour le patch-clamp, sont dissociées à J53 et réensemencées à 500 000 cellules par pétris de 35 mm de diamètre munis d'un fond en verre spécifique à l'imagerie microscopique. Les expériences sont ensuite réalisées à J60. Les hiPSC-CM sont incubées pendant 15 minutes avec la sonde Fluo4-AM à une concentration de 3 μM à température ambiante et à l'obscurité. La solution utilisée pour l'imagerie est la même que la solution de bain pour l'enregistrement des PA au patch-clamp. A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées puis les acquisitions des transitoires calciques sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal inversé à balayage laser (Zeiss, LSM800). Les variations de calcium sont acquises à l'objectif x63. Les transitions calciques sont obtenues de manière spontanée sans stimulation électrique ou chimique. Les enregistrements sont obtenus par balayage linéaire (line-scan, x-t mode) via le logiciel Zen. Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel *Peak Inspector* (<https://www.python.org/download/releases/3.0/>). Plusieurs paramètres sont obtenus tels que la fréquence spontanée des transitoires, l'amplitude maximale, la vitesse de libération du calcium, la vitesse de recapture. L'analyse des *sparks* Ca^{2+} est effectuée via le logiciel *imageJ* avec le plugin *Sparkmaster* afin d'avoir le nombre et la fréquence de ces *sparks*.

3. Étude des propriétés contractiles

La fonction contractile spontanée a été mesurée directement sur les plaques 6 puits à partir de la monocouche d'hiPSC-CM sans dissociation à J60. Les cellules sont incubées dans une enceinte thermostatée à 20% d'O₂ et 5% de CO₂ à 37°C sous un microscope inversé Zeiss équipé d'un objectif 20X. Les vidéos sont enregistrées avec une caméra Orca Fash4 (Hamamatsu) avec une fréquence d'acquisition de 33 ms et une durée d'enregistrement de 25 secondes par position en 16 bits. Une dizaine de positions (avec des zones qui se contractent) ont été choisies par puits. L'analyse des propriétés contractiles a été évaluée grâce à un script d'analyse vidéo sous MATLAB. A partir des vidéos acquis avec le logiciel Zen, les images TIFF correspondantes ont été extraites. Les mouvements de contractions ont été analysés image par image pour chaque vidéo. Ces déplacements sont traités dans le temps, ce qui permet d'obtenir une courbe de déplacement en fonction du temps. Ceci permet de déterminer différents paramètres de la contraction tels que la fréquence spontanée des contractions (bpm), l'amplitude, le temps de contraction, le temps de relaxation, le temps de repos entre deux contractions et enfin le facteur de différenciation. Ce dernier paramètre est un modèle linéaire généralisé reflétant une combinaison linéaire des propriétés contractiles assurant la meilleure discrimination entre le contrôle et les conditions spécifiques du patient. C'est un paramètre qui permet de mieux discriminer les différences entre le sujet sain et le patient ayant bénéficié d'un traitement ou non.

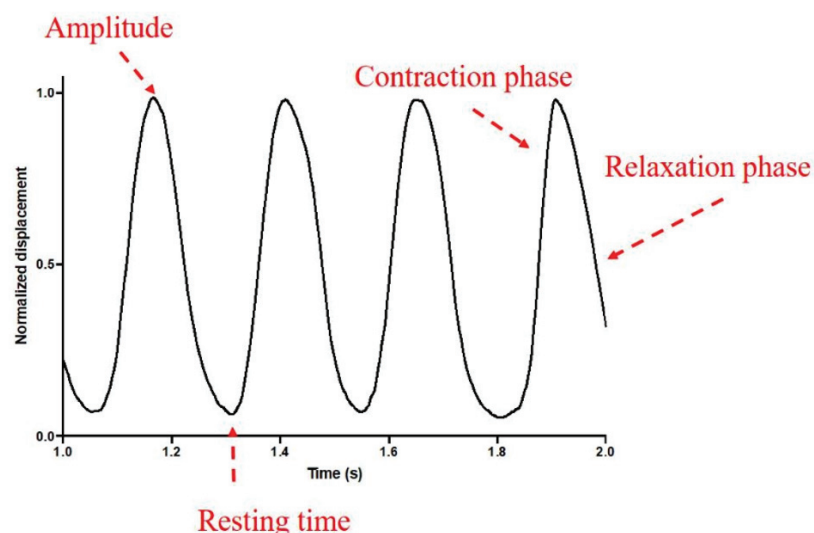


Figure 21 : Illustration du signal obtenu après analyse à partir des vidéos enregistrés

IV. Caractérisation morphologique des hiPSC-CM

1. Microscopie Électronique à Transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique permettant d'observer l'ultrastructure cellulaire sur des coupes fines de l'ordre du nanomètre. Un microscope électronique utilise un faisceau d'électrons pour illuminer l'échantillon et les électrons traversant l'échantillon sont transmis et détectés sur un écran. La préparation de l'échantillon est extrêmement importante et suit un protocole bien précis, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Pour nos observations, la monocouche cellulaire a été fixée avec 2% de glutaraldéhyde dans 0,1 M de tampon de Sorensen à pH 7,4. La fixation est réalisée pendant une heure, puis rincée avec du tampon de Sorensen seul. Le tampon de Sorensen est fréquemment utilisé pour les études en MET par ses propriétés physiologiques, sa stabilité et il est non toxique pour les cellules, comparé au tampon cacodylate (aussi utilisé en MET) mais plus toxique. La préparation de ce tampon est le mélange d'une solution de phosphate de sodium monobasique et d'une solution de phosphate de sodium bibasique. La suite de la préparation des échantillons ainsi que l'observation en MET ont été réalisées au CMEAB (Centre de Microscopie Électronique appliquée à la biologie) de Toulouse, en collaboration avec le Dr. Céline Guilbeau-Frugier. Brièvement, les échantillons subissent une post-fixation à l'osmium et une imprégnation dans une résine époxy qui polymérise à 60°C. L'observation a été réalisée avec un MET-HT-7700 Hitachi 120kV.

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques de l'ensemble des données des expériences décrites ci-dessus, ainsi que les graphes, ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 9). La normalité a été testée à l'aide des tests d'Agostino-Pearson et Shapiro-Wilk. Un test de Kruskal-Wallis t non a été utilisé pour comparer 3 groupes indépendants avec une distribution non paramétrique. Un test de Tuckey a été réalisé pour comparer 3 groupes indépendants avec une distribution paramétrique. Un test T apparié a été utilisé pour comparer 2 groupes appariés avec une distribution paramétrique. Un test de Wilcoxon a été effectué pour comparer 2 expériences appariées avec une distribution non paramétrique. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative. *, $p < 0,05$.

D. Résultats

Étude I : Caractérisation morphologique par microscopie électronique à transmission

L'ultrastructure des cardiomyocytes issus d'hiPSC a été observée par MET. L'objectif de cette approche expérimentale était d'observer et comparer l'ultrastructure cellulaire entre les conditions « contrôles » et « mutés DSC2 ». Les observations ont été réalisées après 60 jours de culture. La MET nous a permis d'étudier le degré de maturité des hiPSC-CM.

En condition contrôle, il est possible d'observer sur la figure 22A que ces cellules ont une organisation structurelle peu organisée et immature, en comparaison de celle des cardiomyocytes adultes. En effet, l'appareil contractile d'un cardiomyocyte adulte représente 90% du volume cellulaire total et est organisé de manière longitudinale. Les hiPSC-CM présentent un appareil contractile bien visible, mais celui-ci représente bien moins de 90% du volume cellulaire. De plus, la limite entre deux cardiomyocytes est difficilement observable. Les noyaux ainsi que des lysosomes et les mitochondries sont également observables chez les hiPSC-CM (Figure 22A). Cependant les mitochondries sont petites et allongées avec une disposition anarchique. Dans un cardiomyocyte mature, les mitochondries sont disposées le long de l'appareil contractile afin de répondre aux forts besoins énergétiques que nécessite la contraction cardiaque. Lorsque l'on rentre plus en détail au niveau de la structure de l'appareil contractile, sur la figure 22B, il est possible d'observer que l'appareil contractile des hiPSC-CM arbore une organisation structurelle convenable. En effet, les bandes observables d'un sarcomère, à savoir les bandes H, I, M et les stries Z sont bien visibles dans notre échantillon (Figure 22B). Les stries Z délimitent chaque sarcomère et correspondent à l'accumulation locale d'alpha-actinine. Les filaments d'actines correspondent à la bande I observable et sont reliés à la titine dans les stries Z *via* l'alpha-actinine. Enfin, la bande M, plus épaisse, correspond à l'accumulation de myosine. La bande H n'est visible que lorsque les cellules musculaires sont dans un état relâché. Cette observation précise de l'appareil contractile nous permet de dire que notre modèle cellulaire, bien qu'immature, présente les molécules essentielles à la contraction cardiaque.

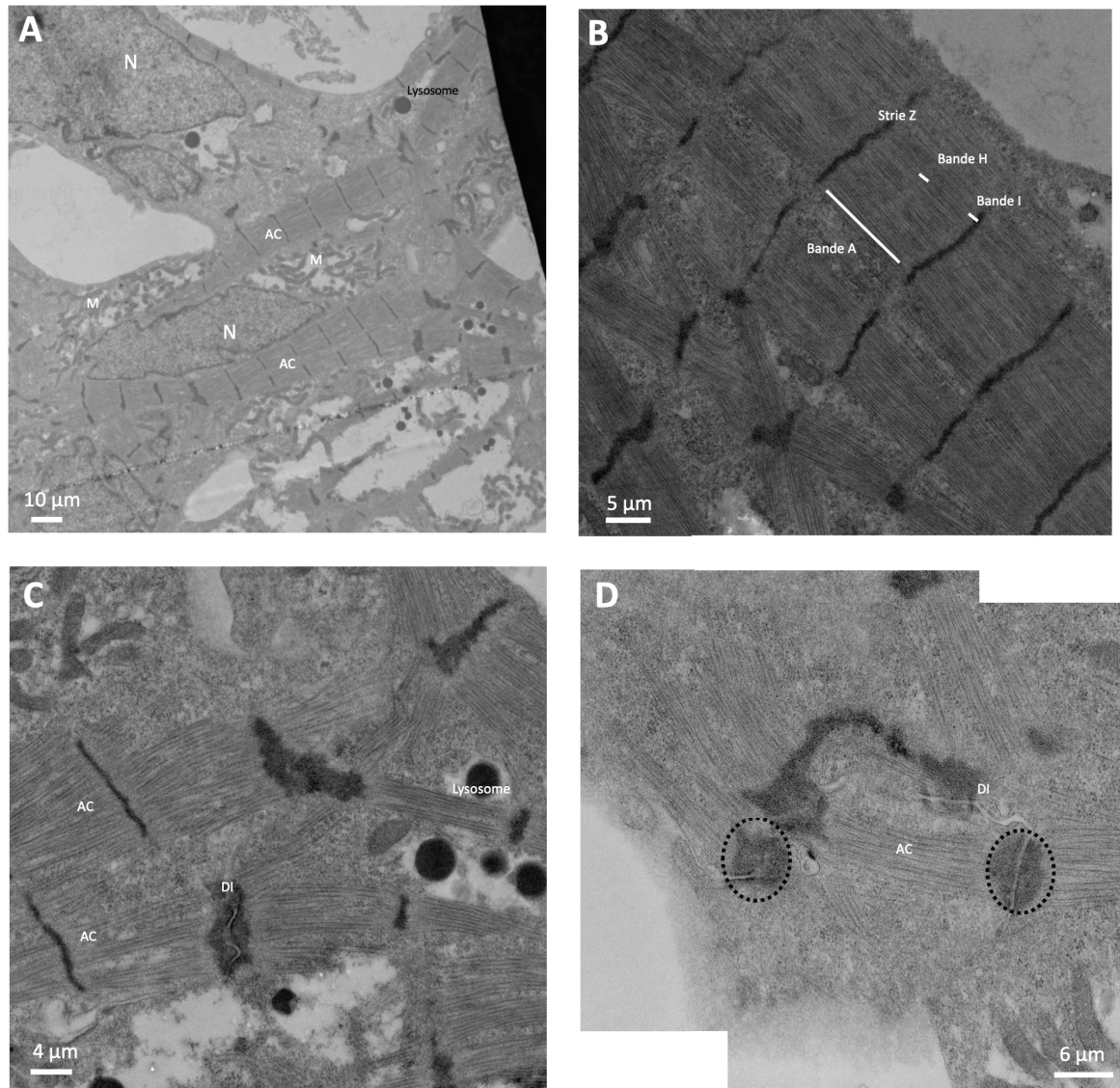


Figure 22 : Étude de l'ultrastructure des hiPSC-CM contrôles

Image globale d'hiPSC-CM contrôles observés par microscopie électronique à transmission à x1000 (A), image de l'appareil contractile observé à x4000 (B), observation de l'appareil contractile et des disques intercalaires à x5000 (C) et x8000 (D) AC : Appareil contractile N : Noyau M : Mitochondrie cercle en pointillé : desmosome DI : Disque intercalaire

Les disques intercalaires (DI) ont également été observés par MET et correspondent aux jonctions entre les cardiomyocytes. Dans un cardiomyocyte humain adulte, ces DI se situent au niveau des extrémités de la cellule, à la suite de l'appareil contractile. Dans les hiPSC-CM, les DI connectent bien deux appareils contractiles de deux cardiomyocytes différents. Cependant, ils sont placés sur tout le tour du cardiomyocyte, en raison de la forme immature de la cellule (Figure 22C et D). En MET, il est possible d'observer au niveau des DI, une zone claire qui délimite la connexion entre les deux cardiomyocytes et une zone plus sombre. Cette zone

sombre témoigne d'une forte densité protéique comprenant, notamment, les desmosomes et les jonctions gap (figure 22D).

La MET permet à la fois l'observation de l'ultrastructure des cardiomyocytes et de leur organisation en monocouche. Néanmoins, contrairement à la structure du muscle cardiaque adulte, la monocouche d'hiPSC-CM ne présente pas d'orientation définie, assurant une contraction orientée et efficace. Cependant, ces cellules arborent bien un appareil contractile et fonctionnel, comprenant les protéines indispensables qui composent le sarcomère. De plus, les disques intercalaires, ainsi que les desmosomes, sont bien visibles, malgré une localisation sur tout le pourtour cellulaire. Ces caractéristiques nous permettent donc de comparer notamment l'appareil contractile et les desmosomes entre les conditions contrôles et mutées DSC2.

L'ultrastructure des hiPSC-CM issus d'un patient (avec mutation DSC2) a également été observée par MET. La comparaison de l'ultrastructure entre les conditions contrôle et mutées met en évidence un appareil contractile moins mature et moins présent dans les cardiomyocytes mutés DSC2 (Figure 23A). En effet, la surface totale de l'appareil contractile mesuré sur imageJ représente 8% du contenu cellulaire global comparé à la condition contrôle où cet appareil contractile représentait environ 45% du volume cellulaire. Lorsqu'on zoome sur l'organisation du sarcomère, les stries Z sont mal définies et les bandes A, H et I ne sont pas observables. De plus, la largeur du sarcomère est plus faible que dans les conditions contrôles (14 μ m hiPSC-CM contrôle vs 5 μ m hiPSC-CM DSC2) (Figure 23A). Ceci pourrait indiquer des défauts de la force de contraction des hiPSC-CM mutés DSC2.

Il est possible d'observer les DI, comprenant les zones claires et les zones sombres chez les cellules mutées DSC2 (Figure 23B). En raison d'un appareil contractile moins bien défini, les DI connectent moins nettement deux unités sarcomériques entre deux cardiomyocytes différents, ce qui rendait leur localisation plus difficile qu'en condition contrôle. Les zones sombres, correspondant à la localisation des desmosomes, apparaissent moins denses que dans les hiPSC-CM contrôles (Figure 23B). Ceci pourrait indiquer une densité de protéines desmosomales moins importante à la membrane plasmique des cellules. Ces observations coïncident avec un défaut d'ancrage et de maintien des desmosomes à la membrane lors d'une mutation atteignant un gène desmosomal dans le cadre de la CA.

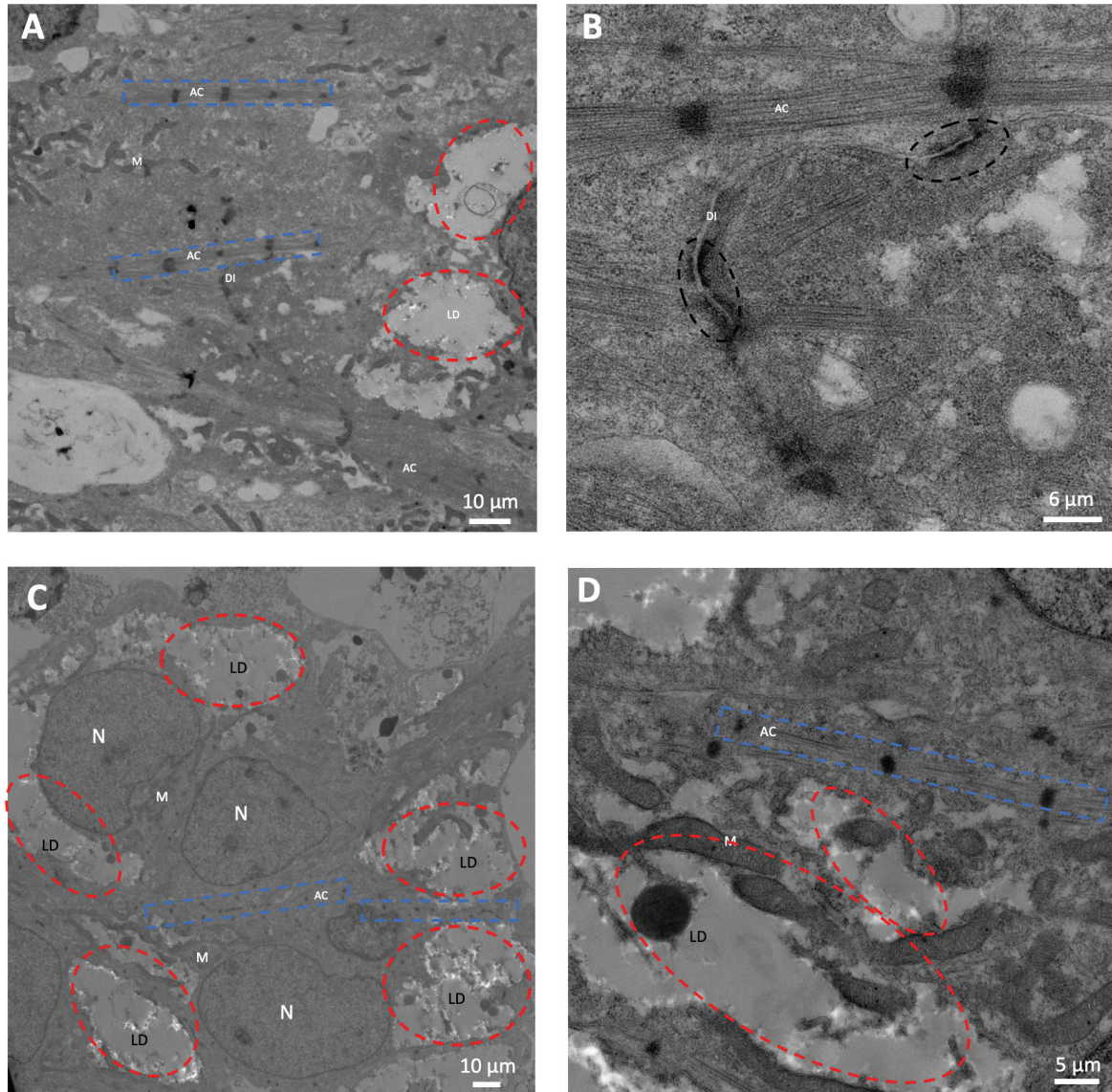


Figure 23 : Étude de l'ultrastructure des hiPSC-CM mutés DSC2

Images d'hiPSC-CM observés par microscopie électronique à transmission à x1500 (A) et zoom sur les disques intercalaires x8000 (B) N : Noyau M : Mitochondrie DI : Disque intercalaire Cercle en pointillé noir : desmosome Rectangle en pointillé bleu : AC : Appareil contractile Cercle rouge pointillé : LD : Lipid droplet

Les cellules issues du patient présentent des gouttelettes/lacs lipidiques (Figure 23C). Cette observation témoigne d'un changement morphologique potentiel de ces cardiomyocytes. De plus, la présence d'un appareil contractile confirme le statut de cardiomyocyte des cellules, attestant bien d'une accumulation lipidique dans ce type cellulaire (Figure 23C et D). Ce phénomène a été également observé, mais dans une moindre mesure, dans les lignées contrôles. En effet, l'accumulation lipidique, mesurée par le logiciel imageJ, représente 20% du contenu cellulaire globale chez les cellules présentant la mutation DSC2, alors que chez les cellules contrôles, cette accumulation lipidique représente seulement 4%. La présence de gouttelettes

lipidiques dans les hiPSC-CM DSC2 conforte notre hypothèse de transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes.

La MET nous a permis de comparer l'ultrastructure des hiPSC-CM entre les conditions contrôles et mutées DSC2. Globalement, les cellules DSC2 présentent un appareil contractile pauvre et moins bien structuré. Ainsi, la caractérisation de la contraction à partir de monocouches d'hiPSC-CM pourrait établir une corrélation entre cette observation et sa fonction. De plus, la densité des desmosomes est plus faible dans cette condition comparée à la condition contrôle ; ce qui témoigne d'un défaut d'ancrage et de maintien des desmosomes à la membrane plasmique. Enfin, l'accumulation lipidique dans les hiPSC-CM DSC2 démontre un changement morphologique cellulaire et renforce notre hypothèse de transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes.

Notre modèle cellulaire récapitule, au niveau morphologique, le phénotype observé dans d'autres modèles cellulaires et chez le patient. En effet, un changement morphologique ainsi qu'une accumulation lipidique ont déjà été observés chez des cellules HL-1 et sur des hiPSC-CM (Garcia-Gras et al. 2006; Caspi et al. 2013). Ceci conforte notre hypothèse de transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes. Cependant, le rôle de la transdifférenciation sur l'aspect fonctionnel et électrophysiologique est manquant. C'est pourquoi la suite de nos travaux de thèse se sont concentrés sur ces aspects.

Étude II : Développement et caractérisation fonctionnelle du modèle DSC2 hiPSC-CM

La CA est une maladie cardiaque héréditaire rare caractérisée par des arythmies ventriculaires qui s'expliquent souvent par des anomalies structurales affectant la conduction. Sa prévalence est estimée à 1/1000 à 1/5000 et est liée dans 50% des cas à une mutation sur des gènes codant pour les protéines desmosomales. La maladie se développe en trois phases : une phase silencieuse, sans dysfonctionnement mécanique mais avec des risques de mort subite cardiaque, suivie d'une altération structurale du myocarde et enfin une dégénération vers une insuffisance cardiaque. Malgré cette connaissance du développement de la pathologie, des études complètes sur l'instabilité électrique des cellules font défaut. Notre modèle d'hiPSC-CM, à partir d'un patient présentant la mutation (c.394C>T) sur le gène codant pour la DSC2, nous permet de mieux comprendre l'arythmogénèse de la CA. Des échantillons sanguins ont été prélevés chez le patient afin de reprogrammer ces cellules en hiPSC. Les hiPSCs ont ensuite été différenciés en cardiomyocytes en suivant le protocole défini précédemment. La pathogénicité de ce variant a été confirmée à l'aide d'un modèle de poisson zèbre. Les hiPSC-CM de contrôle et du patient ont été utilisées pour examiner les altérations électromécaniques spécifiques de la mutation et modéliser les effets de médicaments anti-arythmiques.

Dans cette étude, la pathogénicité de la substitution DSC2 p.R132C a été confirmée dans le modèle de poisson zèbre. En effet, deux constructions différentes, chez le modèle de poisson zèbre aboutissant à un défaut la protéine DSC2 (*knock-down*), présentent une diminution du volume d'éjection systolique ainsi qu'une diminution de la contraction ventriculaire. Ces résultats sont en lien avec ce qui est observé, en clinique, chez des patients diagnostiqués de la CA. L'injection de l'ARNm DSC2 contrôle, chez le poisson zèbre défectueux pour la DSC2, prévient ces défauts précédemment observés. Cependant, l'injection de l'ARNm présentant la substitution R132C (du patient) ne permet pas de rétablir les fonctions contractiles des ventricules chez le poisson zèbre. Ces expériences confirment que la mutation R132C induit des défauts fonctionnels *in-vivo*.

L'utilisation des hiPSC-CM provenant du patient portant une mutation sur le gène DSC2 a démontré que l'apparition d'arythmies constitue un mécanisme pathologique direct et n'est pas uniquement une conséquence du remodelage tissulaire. Premièrement, nous avons évalué la fonction contractile de notre modèle d'hiPSC-CM, à partir de la monocouche cellulaire après 60 jours de différenciation, en utilisant une analyse vidéo. Les hiPSC-CM mutés DSC2 présentent une fréquence de battements spontanés accrus et une diminution de la durée de

contraction. L'enregistrement de vidéos, nous permet d'analyser le nombre d'évènements de contraction aberrants. Les vidéos enregistrés des hiPSC-CM, provenant du patient, présentent 35% d'évènements aberrants, alors que les hiPSC-CM contrôles en arborent seulement 25%. Les expériences de contractilité, à partir d'enregistrements vidéo, ont permis de démontrer que les hiPSC-CM mutés pour la DSC2 présentent des défauts contractiles avec un nombre d'évènements arythmiques accrus.

Après avoir confirmé les défauts contractiles de notre modèle, et afin de mieux comprendre son origine, nous avons étudié plus en détail l'aspect électrophysiologique des hiPSC-CM. Nous avons enregistré les PA spontanés à l'aide de la technique de patch-clamp. Nous observons une augmentation de la fréquence spontanée des PA, accompagner d'une diminution de la durée du PA chez les hiPSC-CM mutés DSC2 par rapport aux hiPSC-CM contrôle. L'enregistrement des PA des hiPSC-CM a également été effectué à 1 Hz afin de s'affranchir de la différence de fréquence spontanée de déclenchement des PA. Nous observons également une diminution de la durée du PA dans cette condition, confirmant nos résultats qui ne dépendent donc pas de la fréquence des PA. La diminution de la durée du PA est en accord avec une augmentation de la densité de courant potassique observée chez les cellules mutées DSC2. De plus, nous observons une diminution des courants sodiques et calciques (enregistrés par l'ion baryum) chez les hiPSC-CM du patient. Ces mesures électrophysiologiques démontrent une instabilité électrique dans les cellules portant la mutation R132C du gène DSC2.

Les défauts contractiles peuvent aussi être causés par une dynamique calcique intracellulaire altérée. Pour cela, nous avons étudié les dynamiques calciques spontanées de notre modèle cellulaire à l'aide de l'imagerie calcique, utilisant la sonde calcique non-ratiométrique Fluo-4 AM. Tout comme l'activité électrique, nous observons une fréquence de transitoire calcique spontané plus importante chez les hiPSC-CM DSC2. De plus, nous observons une amplitude ainsi qu'une durée de recapture calcique diminué chez ces cellules comparées aux cellules contrôles. Les évènements calciques aberrants (*sparks*) ont une fréquence augmentée chez les hiPSC-CM DSC2, avec notamment, 85% de cellules mutées DSC2 présentant des *sparks*, comparé aux 65% de cellules contrôles.

Ces résultats confirment un défaut fonctionnel dans notre modèle de CA. En effet, l'augmentation de la fréquence des contractions accrue est en lien avec une augmentation de la fréquence des PA spontanés observés dans notre modèle. De plus, les défauts de contractilité, observés aussi bien dans les hiPSC-CM que chez le poisson zèbre, peuvent s'expliquer par une diminution de la durée du PA ainsi qu'un défaut de la dynamique calcique, avec une

augmentation des *sparks* calciques, comme facteur déclencheur des arythmies. Ceci confirme une origine myogénique de l'instabilité électrique chez les patients atteints de CA.

A partir de cette validation fonctionnelle de notre modèle, nous avons testé différentes molécules anti-arythmiques, utilisées en clinique, afin de mieux comprendre leur impact chez le patient. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de la flécaïnide, un bloqueur du canal sodique, sur les transitoires calciques. La flecaïnide a normalisé la fréquence ainsi que l'amplitude des transitoires calciques spontanés. De plus, cette molécule a eu pour conséquence de diminuer le pourcentage des *sparks* calciques observées chez les hiPSC-CM mutés DSC2, confirmant ainsi son potentiel anti-arythmique. L'action de la flecaïnide sur les dynamiques calciques et les fuites de calcium par le RYR peut se faire de façon directe ou indirecte (Salvage et al. 2018). En effet, une normalisation des *sparks* calciques par la flécaïnide est médiée par son action d'antagoniste du canal sodique (N. Liu et al. 2011). D'autres études sur la CPVT rapportent un effet direct de la flécaïnide sur le RYR, induisant une diminution de fuite calcique (Watanabe et al. 2009; Hilliard et al. 2010). Il est plus probable, que dans le cadre de CA, l'action de la flécaïnide soit directe sur le RYR, en raison d'une diminution de courants sodiques dans cette pathologie. Nous avons également étudié l'effet du sotalol sur notre modèle cellulaire. Le traitement au sotalol a normalisé la fréquence spontanée des contractions, en lien avec une normalisation de la fréquence spontanée des PA. De plus nous avons observé une réduction significative des événements contractiles anormaux, accompagné d'une normalisation du pourcentage de cellules enregistrées, en patch clamp, présentant des événements électriques aberrants. L'effet du sotalol sur les canaux potassiques a été confirmé par le E-4031. Cette molécule confirme l'allongement du PA dû au blocage des canaux potassiques. En conclusion, ces résultats démontrent un remodelage électrique et calcique des hiPSC-CM révélant une dynamique de repolarisation anormale et met en lumière l'effet bénéfique du sotalol et la flecaïnide, rationalisant la prescription de ces molécules anti-arythmiques (Ermakov and Scheinman 2015; Wichter et al. 1992).

Dans cette étude, le modèle du poisson zèbre a été utilisé pour modéliser la pathogénicité de la mutation DSC2 liée à la CA au niveau tissulaire. Ce modèle présente l'avantage d'être rapide à mettre en place, par rapport à d'autre méthode comme CRISPR-Cas9. La technologie CRISPR-Cas9 est intéressante pour valider la pathogénicité spécifique d'une mutation. Cependant elle est compliquée à mettre en place, notamment sur des hiPSCs, et des effets secondaires non spécifiques peuvent apparaître à la suite de cette manipulation génétique (effets « *off-target* »). De plus, le modèle de poisson zèbre permet d'étudier l'effet de la mutation sur

un cœur entier et apporte une diversification des modèles utilisés. Pour ces raisons, nous avons préféré utiliser le modèle du poisson zèbre pour valider la substitution R132C de la DSC2.

A partir des hiPSCs spécifiques du patient portant une mutation sur le gène codant pour la DSC2, nous avons étudié les mécanismes arythmogènes de la CA. En plus de démontrer un remodelage morphologique, observé par MET, l'arythmogenèse de la CA a également une origine électrique cellulaire directe. En effet, nous avons pu constater que les défauts de contractions ainsi que l'arythmogénicité sont dus à un remodelage électrique et calcique. Premièrement, l'apparition de *sparks* calciques plus fréquents dans notre modèle de CA, induit une augmentation de l'excitabilité cellulaire. Ceci est retrouvé dans les expériences de patch-clamp, où la fréquence des PA spontanés est plus importante avec également l'apparition d'évènements arythmiques accrus. L'excitabilité cellulaire accrue peut être considérée comme à un facteur déclencheur de l'arythmie. La flécaïnide a pour effet de normaliser les dynamiques calciques chez les hiPSC-CM DSC2, démontrant ainsi son potentiel anti-arythmique chez les patients. De plus, la durée du PA raccourcie, dû à une augmentation de la densité de courant potassique, est en lien avec un défaut de l'intervalle QT chez les patients de la CA (Philippe Chevalier et al. 2021). Cette repolarisation précoce crée une dispersion de la repolarisation, car toutes les cellules ne vont pas subir un remodelage électrique. En effet, certaines cellules vont présenter un PA normal alors que d'autres cellules subissent un remodelage électrique et donc un PA court. Cette dispersion de la repolarisation induit un bloc de conduction, fournissant un substrat propice aux arythmies de réentrées (Giudicessi and Ackerman 2012). Ces résultats expliquent la haute efficacité du sotalol chez ces patients (Ermakov and Scheinman 2015). En effet, le sotalol normalise la durée des PA, par son action sur les courants potassiques, aboutissant à la réduction des arythmies.

Pour résumer, la littérature propose globalement que l'apparition des arythmies soit principalement causée par le remplacement fibro-adipeux dans le ventricule droit. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'origine myogénique dans l'arythmogenèse de la CA. Les hiPSC-CM fournissent un modèle centré sur la cellule. En effet dans cette étude, nous avons élucidé les mécanismes pro-arythmiques cellulaires liés à un remodelage électrique et calcique. L'apparition de *sparks* calciques plus fréquents ainsi qu'un PA court fournit un facteur déclencheur et un substrat arythmogène propice aux déclenchements et au maintien des arythmies ventriculaires (Tse 2016). De plus, cette étude décrit les mécanismes d'actions moléculaires de médicaments anti-arythmiques utilisés chez le patient. Ces molécules normalisent les défauts calciques et électriques.

RESEARCH ARTICLE

Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: From ion channels to ECG and tailored drug therapy

Adrien Moreau¹ | Jean-Baptiste Reissq^{1,2} | Helene Delanoe-Ayari³ | Marion Pierre¹ | Alexandre Janin^{2,4,5} | Antoine Deliniere⁴ | Francis Bessière⁴ | Albano C. Meli¹ | Azzouz Charrabi¹ | Estele Lafont² | Camille Valla² | Delphine Bauer² | Elodie Morel² | Vincent Gache² | Gilles Millat^{2,4,5} | Xavier Nissan⁶ | Adele Faucherre⁷ | Chris Jopling⁷ | Sylvain Richard¹ | Alexandre Mejat² | Philippe Chevalier^{2,4}

¹PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier, Montpellier, France

²Neuromyogène Institut, Claude Bernard University, Lyon 1, Villeurbanne, France

³Institut lumière matière, Claude Bernard University, Lyon 1, Villeurbanne, France

⁴Service de Rythmologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Laboratoire de Cardiogénétique moléculaire, Centre de biologie et pathologie Est, Bron, France

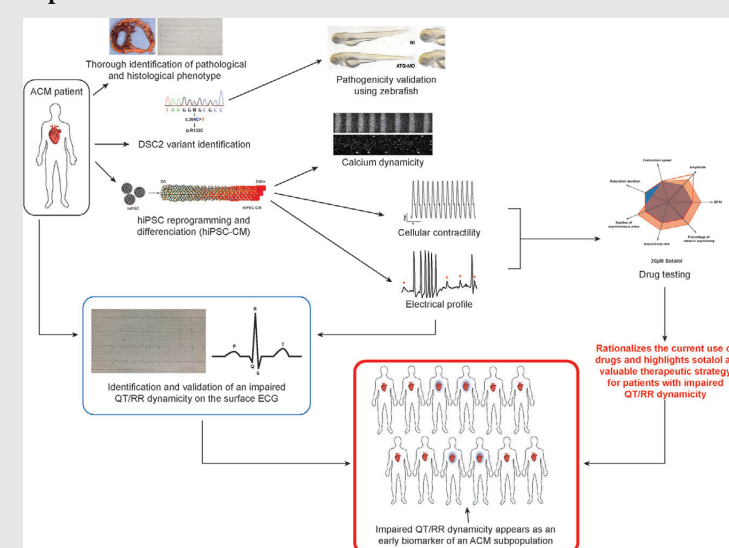
⁶CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes, France

⁷IGF, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

Correspondence

Philippe Chevalier, Service de Rythmologie, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France. Email: philippe.chevalier@chu-lyon.fr

Graphical Abstract



Thorough analysis of hiPSC-CM derived from a DSC2 patient, zebrafish and patient cohort, we identified abnormal repolarization dynamicity, prompting the discovery of a short QT interval in some ACM patients. By normalizing the increased repolarization reserve of ACM myocytes, class 3 AADs are likely to be the drugs of first choice for DSC2 patients. These findings may encourage randomized trials to evaluate class 3 antiarrhythmic drugs, alone or in combination with class I medications in ACM patients.

RESEARCH ARTICLE

Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: From ion channels to ECG and tailored drug therapy

Adrien Moreau¹  | Jean-Baptiste Reissq^{1,2} | Helene Delanoe-Ayari³ |
Marion Pierre¹ | Alexandre Janin^{2,4,5} | Antoine Deliniere⁴ | Francis Bessière⁴ |
Albano C. Meli¹ | Azzouz Charrabi¹ | Estele Lafont² | Camille Valla² |
Delphine Bauer² | Elodie Morel² | Vincent Gache² | Gilles Millat^{2,4,5} |
Xavier Nissan⁶ | Adele Faucherre⁷ | Chris Jopling⁷ | Sylvain Richard¹ |
Alexandre Mejat² | Philippe Chevalier^{2,4}

¹ PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier, Montpellier, France

² Neuromyogène Institut, Claude Bernard University, Lyon 1, Villeurbanne, France

³ Institut lumière matière, Claude Bernard University, Lyon 1, Villeurbanne, France

⁴ Service de Rythmologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵ Laboratoire de Cardiogénétique moléculaire, Centre de biologie et pathologie Est, Bron, France

⁶ CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes, France

⁷ IGF, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

Correspondence

Philippe Chevalier, Service de Rythmologie, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France.
Email: philippe.chevalier@chu-lyon.fr

Funding information

Federation Francaise de Cardiologie

Abstract

Background: Severe ventricular rhythm disturbances are the hallmark of arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM), and are often explained by structural conduction abnormalities. However, comprehensive investigations of ACM cell electrical instability are lacking. This study aimed to elucidate early electrical myogenic signature of ACM.

Methods: We investigated a 41-year-old ACM patient with a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene, which encodes desmocollin 2. Pathogenicity of this variant was confirmed using a zebrafish *DSC2* model system. Control and *DSC2* patient-derived pluripotent stem cells were reprogrammed and differentiated into cardiomyocytes (hiPSC-CM) to examine the specific electromechanical phenotype and its modulation by antiarrhythmic drugs (AADs). Samples of the patient's heart and hiPSC-CM were examined to identify molecular and cellular alterations.

Results: A shortened action potential duration was associated with reduced Ca^{2+} current density and increased K^{+} current density. This finding led to the elucidation of previously unknown abnormal repolarization dynamics in ACM patients. Moreover, the Ca^{2+} mobilised during transients was decreased, and the Ca^{2+} sparks frequency was increased. AAD testing revealed the following: (1) flecainide normalised Ca^{2+} transients and significantly decreased Ca^{2+} spark occurrence and (2) sotalol significantly lengthened the action potential and normalised the cells' contractile properties.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

Conclusions: Thorough analysis of hiPSC-CM derived from the *DSC2* patient revealed abnormal repolarization dynamics, prompting the discovery of a short QT interval in some ACM patients. Overall, these results confirm a myogenic origin of ACM electrical instability and provide a rationale for prescribing class 1 and 3 AADs in ACM patients with increased ventricular repolarization reserve.

KEYWORDS

action potential duration, arrhythmogenic cardiomyopathy, desmocollin, hiPSC-CM, QT duration

1 | INTRODUCTION

Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) refers to a group of rare hereditary cardiac diseases characterised by lethal ventricular arrhythmias (VA) and progressive fibro-fatty replacement of myocardial tissue. Its prevalence is estimated at one in 2000–5000.^{1–4} The disease develops in three stages: (1) a concealed phase, with no mechanical dysfunction but a risk of sudden cardiac death, followed by (2) myocardial structural alteration and (3) progression towards heart failure.^{3,5} Mutations in genes coding for desmosomal proteins are common in the right ventricular form of ACM disease.^{3,6} *PKP2* mutations are the most common, whereas *DSC2* are among the rarest (1%–2%).³ Gehmlich et al. identified two missense mutations of *DSC2* gene (R203C and T275 M) that showed defects in proteolytic cleavage, a process that is essential for activated cadherins.⁷ Although *DSC2* variants are rare in patients with ACM, their pathogenic role has been consistently demonstrated. A case report by Christensen and co-workers have suggested a functional role of *DSC2* c.1445G>C in a 31-year-old White male with ACM complicated with ventricular fibrillation.⁸ Knockdown of the *DSC* orthologue in zebrafish caused a cardiomyopathy phenotype.⁹ In a transgenic mice model with cardiac specific overexpression of *DSC2*, severe myocardial necrosis, fibrosis and inflammation mimicking ACM were found.¹⁰

Desmosomes are structures located at intercalated discs in the myocardium tissue. They are responsible for intercellular adhesion and composed of three main protein families: cadherins (desmocollins (*DSC*) and desmogleins (*DSG*)), armadillo proteins (junction plakoglobin (*JUP*) and plakophilins (*PKP*)) and plakins (desmoplakin (*DSP*)).^{1,11–14} Desmocollins (*DSC*) and desmogleins (*DSG*) mediate cell–cell interaction through their extracellular domain. Their intracellular domain is connected to cytoskeleton proteins through adaptors, which are junction plakoglobin (*JUP*), plakophilin-2 (*PKP2*) and terminally desmoplakin (*DSP*). This desmosomal pro-

tein complex consequently ensures solid intercellular junctions and notably explains why these structures are mainly found in stretched tissues such as the skin or the heart.^{1,15–17} Desmosomes were initially described to have a specific physical role of intercellular adhesion, linking intracellular cytoskeleton to extracellular cadherins domain. Desmosome physical destabilization leading to cardiomyocyte death and fibro-fatty replacement constituted the first proposed pathomechanism of ACM.^{11,14,17} A parallel hypothesis underlying the fibro-fatty inclusion in ACM comes from the potential trans-differentiation of cardiomyocytes into adipocytes.¹⁸

The ACM pathogenesis is not fully understood. Prescription of antiarrhythmic drugs (AADs) remains partly empirical and automatic defibrillators are often implanted. Human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be used to elucidate disease mechanisms.^{19–21} Studies using cardiomyocytes derived from ACM patient-specific hiPSCs (hiPSC-CM) are expected to enable a better understanding of arrhythmogenesis.^{22,23} Here, a thorough functional description of hiPSC-CM from a *DSC2* ACM patient revealed primary electrical abnormalities and responsiveness to AADs. Of note, we found that a short QT interval at low heart rate is characteristic of *DSC2* ACM.

2 | METHODS

The local ethics committee approved the study protocol (DC-2008-72/DC-2019-3464). The study was conducted according to the principle of the declaration of Helsinki. Informed consents were obtained for all cases.

2.1 | Biological samples

Biological samples were collected from the ACM patient or the control after cardiac transplantation. The explanted heart of the ACM patient was subjected to macroscopic

and histopathological examinations. Myocardial samples were collected from the anterior and posterior left and right ventricular walls. Specimens were either formalin fixed and paraffin embedded for histological investigation or snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA analysis. RNA extraction was performed as described below.

Histological sections for light microscopy were stained with the haematoxylin–eosin–safran (HES) technique.

2.2 | Patient cohort analysis

The study was retrospective and involved 79 patients (nine women and 70 men) with an average age of 36 years at the time of their first documented ventricular tachycardia (VT) and admitted to hospital between 1971 and 2016. The patients were diagnosed using Task Force criteria.²⁴ Fifty-nine patients were treated by AADs alone; 17 by AADs and tachycardia ablation. An automatic defibrillator was implanted in five patients. Familial forms of ACM were observed in 38% (including diverse genetic profiles). Forty-one patients had sustained VT and 18 patients had nonsustained VT. The abnormalities of the right ventricular wall motion on ventriculography were localised in 45% of cases and diffused in 55% of cases.

2.3 | Genetic analysis

Blood samples from the ACM patient were subjected to direct sequencing to investigate six ACM-related genes (*RYR2*, *PKP2*, *DSG2*, *DSC2*, *DSP*, *CASQ2* and *JUP*). Genomic DNA was extracted from leucocytes present in whole blood samples with the classical phenol chloroform technique. Each exon and all intron–exon junctions for the studied genes were amplified with primers designed with PRIMER3 software (characteristics of primers available upon request). The entire coding sequences were analysed for the following genes: *JUP* (Online Mendelian Inheritance in Man identifiers: OMIM 173325, MN_021991.2, transcript 745aa), *DSP* (OMIM 125647, MN_004415.2, transcript 2871aa), *PKP2* (OMIM 602861, MN_004572.3, transcript 881aa), *DSG2* (OMIM 125671, MN_001943.3, transcript 1118aa) and *DSC2* (OMIM 125645, MN_024422.3, transcript 901aa). Direct sequencing was performed with BYG DYE dideoxy-terminator chemistry (Perkin Elmer) on an ABI 3830 DNA sequencer (PE Applied Biosystems). Analysis of the chromatograms was performed with SeqScape (PE Applied Biosystems). Analysis of all five genes was performed in all samples, even when a mutation was identified in a given gene. A control group of 300 healthy unrelated subjects

(600 alleles) of Caucasian origin was also genetically profiled for comparison.²⁵

2.4 | Culture and differentiation of hiPSC

Biological samples were handled in accordance with the Declaration of Helsinki with informed consent and standardised approved protocols by a local ethic committee.

Both controls hiPSC lines were a kind gift from (1) the platform iPS_INMG (hiPSC AG08C5; neuromyogen institute, Lyon)²⁶ and from (2) Xavier Nissan (hiPSC Fsc03; I-Stem institute, Evry). Both control hiPSC lines were derived from males. Patient-specific hiPSC were reprogrammed and characterised at Phenocell (Evry, France) core facility using the episomal transfection of five reprogramming factors: Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc and Lin28. The reprogramming process was performed on skin fibroblasts, in feeder-free condition with the STEMACS IPS Brew-XF medium. All hiPS cells used underwent a standard validation procedure notably including the validation of pluripotency markers and differentiation potential.

The hiPSC were grown on an hESC-qualified Matrigel™ (Corning) and adapted to StemFlex™ medium (ThermoFisher Scientific) and were passaged using TrypLE™ Express (ThermoFisher Scientific). The published sandwich monolayer technique was adapted to differentiate hiPSC.^{19,20,27} In brief, hiPSC were dissociated with TrypLE™ Express and 30,000–50,000 cells/cm² were plated on hESC-qualified Matrigel in StemFlex™ medium for 4 days with daily media replacement. The next day, the medium was replaced by StemFlex™ medium supplemented with Matrigel growth factor reduced (MGFR; 0.04 mg of Matrigel protein per millilitre of medium). The differentiation process was then induced with RPMI 1640 medium supplemented with B27 supplement minus insulin (1×), 6 μM CHIR99021 (LC Laboratories) and MGFR (0.04 mg of Matrigel protein per millilitre of medium) for 2 days. On day 2, the medium was replaced by RPMI 1640 supplemented with B27 supplement minus insulin (1×). On days 3 and 5, the medium was replaced by RPMI 1640 supplemented with B27 supplement minus insulin (1×). At day 3 specifically, the medium was supplemented with 2 μM of Wnt-C59 (LC Laboratories). At days 7 and 9, the medium was replaced with RPMI 1640 supplemented with B27 supplement minus insulin (1×). The medium was renewed three times a week with RPMI 1640 supplemented with B27 supplement (1×). The differentiation process resulted in spontaneously beating cells observed from day 7. When required, after 23 or 53 days of differentiation, cells were enzymatically dispersed using TrypLE™ Express. When required, cells were frozen using a standard protocol. The freezing medium consisted 50%

of RPMI 1640 with B27 supplement, 40% of foetal bovine serum and 10% of dimethyl sulfoxide.

2.5 | Reverse transcription

Total RNA was extracted from hiPSC-CM (D60 of differentiation) using Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Ozyme) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Based on 500 ng of total RNA extracted from the hiPSC-CM, reverse transcription was performed using the GoScript Reverse Transcription system (Promega) according to the manufacturer's protocol.

2.6 | Reverse transcription and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis

hiPSC-CM cDNA were measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) with the SYBR Green PCR kit for LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to manufacturer's recommendations. The Rotor-Gene Q real-time PCR Cycler 1 run protocol consisted of initial Taq activation at 95°C for 10 min followed by 39 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and fluorescence reading at each cycle end. Finally, Taq is inactivated at 65°C for 30s. To control for amplification variations due to differences in the starting mRNA concentrations, we used the ribosomal protein L22 (*RPL22*) mRNA as an internal control. The mRNA levels for each tissue were normalised to the *RPL22* mRNA levels. The quantifications were computed from the threshold cycle values obtained for the gene of interest and the efficiency of the primer set with Rotor-Gene® Q software.

Heart samples (patient or control) synthesised cDNA was measured by qRT-PCR with the SYBR Green PCR kit for LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to manufacturer's recommendations. LightCycler experimental run protocol consisted of initial Taq activation at 95°C for 8 min and 45 cycles of 95°C for 15 s, 68°C for 5 s and 72°C for 7 s. Quantification was performed with a single fluorescence measurement. To control for amplification variations due to differences in the starting mRNA concentrations, we used the ribosomal protein L21 (*RPL4*) mRNA as an internal control. The mRNA levels for each tissue were evaluated relative to the *RPL4* mRNA levels. The quantifications were computed from the threshold cycle values obtained for the gene of interest and the efficiency of the primer set with RealQuant software (Roche Diagnostics).

Healthy donor's cardiac tissue was obtained from a 48-year-old patient without any family history of cardiac disease. It was used as a reference to compare mRNA expression with patient's RV.

2.7 | Immunostaining

2.7.1 | Heart sections

Cardiac segments embedded in paraffin blocks were cut into 4 µm slides. The Ventana Roche automated immunohistochemistry stainer (Discovery XT) was used. Detection of immunoreactivity was performed with the Ventana Ultraview DAB Kit. Antigen retrieval was performed in citrate buffer. Sections were incubated with antibody anti-plakoglobin (i.e. α -catenin) (rabbit polyclonal, Cell signaling technology, #2309). Haematoxylin and bluing reagent were used for counterstaining.

2.7.2 | hiPSC-CM immunolabelling

Seven days prior to experiments, hiPSC-CM cells were dissociated and plated onto glass coverslips. The cells were fixed using 37°C PBS – 4% paraformaldehyde – 4% sucrose solution for 20 min. Cells were then permeabilised for 30 min at room temperature using 0.1% triton in a PBS – 1% bovine serum albumin solution. Primary anti-bodies to detect myosin–light chain–2v (mlc2v, 1:300, AP02680PU–N, Acris antibodies), desmocolin 2 (Progen 610120)) were incubated overnight at 4°C. Fluorophore-conjugated secondary anti-bodies (Alexa Fluor® 488 goat anti rabbit (1:250, A11070, Life Technologies)) were incubated for 1 h at room temperature. The nucleus was labelled using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride). Cells were observed on a Zeiss LSM confocal microscope with a 63× oil objective equipped with appropriate laser and filters.

Images of the mlc2v protein obtained with the confocal microscope were extracted and converted into 8-bit grey scale. Images were then studied using a homemade Matlab® analysis script to evaluate sarcomeres characteristics (cell area covered by a labelling, organization into doublets, sarcomeres orientation).

2.8 | Western blot

Control and patient heart samples were snap frozen in liquid nitrogen. Proteins from sample lysate were then isolated. Equal amounts of total proteins (50 µg) were denatured in Laemmli buffer (Sigma), resolved on 10%

SDS–polyacrylamide gel and blotted onto 0.45 μm Immobilon polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked and then incubated with primary antibody (Rabbit-anti-DSC2, Progen 610120) followed by appropriate anti-rabbit horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies.

2.9 | hiPSC-CM contraction analysis

The hiPSC-CM contractile function was assessed through a patented custom-made video analysis. For this purpose, hiPSC-CM monolayers (without any cellular dissociation) in six-well dishes were placed on the stage of an inverted microscope equipped with a 10 \times objective and an incubation chamber. The temperature and CO_2 levels were set as follow: 37°C, 5% (humid atmosphere). Cells were allowed to stabilise for at least 15 min prior to any recordings. Phase contrast videos were acquired at 30 frames per second. Videos were then processed: TIFF images were extracted, and contrasted particles displacement was tracked frame by frame for each video. The displacement of each contrasted particles was then processed through the time resulting in a curve of the displacement as a function of time. Areas with similar contractile behaviour are clustered and contractile parameters quantified.

2.10 | Electrophysiology

Patch clamp experiments were performed at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) at least 5 days after dispersion of the hiPSC-CM (using TrypLE express®). For all experiments, the liquid junction potential between the patch pipette and the bath solution was not corrected. Pipettes were made from borosilicate glass capillaries and fire-polished. For voltage-gated sodium (Na^+) channels recordings (voltage-clamp experiments), pipettes were coated with HIPEC (Dow–Corning, Midland, MI, USA) to minimise electrode capacitance.

Action potentials (APs) were evaluated using the whole cell configuration (in current clamp mode). The gap-free mode was used to record spontaneous APs. For this purpose, the electrical activity was recorded at basal state. For other current clamp experiments, APs were elicited following injection of a 3 ms, 20–1500 pA rectangular current pulse at different rates (0.5, 1 and 2 Hz). The patch pipettes (resistance 2–5 mOhm) were filled with a solution containing (in mmol/L): 10 NaCl, 122 KCl, 1 MgCl_2 , 1 EGTA and 10 Hepes; pH was adjusted at 7.3 with KOH. The bath solution (external current clamp) was composed of (in mmol/L): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 8

Glucose and 10 Hepes; the pH was adjusted at 7.3 with 1 N NaOH.

Macroscopic Na^+ currents were recorded using the whole-cell configuration but under voltage-clamp conditions. The patch pipettes (resistance 1–2 mOhm) were filled with a solution containing (in mmol/L): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA and 10 Hepes; pH was adjusted to 7.4 using 1 N CsOH. The bath solution was composed of (in mmol/L): 105 NMDG, 35 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, 10 Hepes, 10 TEA-Cl and 0.5 Nimodipine; pH was adjusted to 7.4 using methanethiosulfonic acid. Voltage-clamp command pulses were generated by a microcomputer using pCLAMP software v10 (Axon Instruments). Na^+ currents were filtered at 5 kHz, digitised at 10 kHz and stored on a microcomputer equipped with an AD converter (Digidata 1440A, Axon Instruments). P/4 leak subtraction was used prior to test pulses.

For macroscopic voltage-gated calcium (Ca^{2+}) and potassium (K^+) channels recordings, similar experimental condition was used but with no P/4 leak subtraction. For Ca^{2+} channels currents, the patch pipettes were filled with a solution containing (in mmol/L): 35 CsCl, 100 CsF, 5 Na_2ATP , 10 EGTA and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 using 1 M KOH. The bath solution consisted (in mmol/L): 140 TEA-Cl, 2 KCl, 2.5 BaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 glucose and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 using 1 M KOH.

For K^+ currents, the patch pipets were filled with a solution containing (in mmol/L): 10 NaCl, 122 KCl, 1 MgCl_2 , 1 EGTA and 10 Hepes; pH was adjusted at 7.3 with KOH. The bath solution (external current clamp) was composed of (in mmol/L): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 8 Glucose and 10 Hepes; the pH was adjusted at 7.3 with 1 N NaOH.

2.11 | Calcium handling studies

For Ca^{2+} transient measurements, hiPSC-CMs were loaded with 3 μM Fluo-4 AM Ca^{2+} indicator (Molecular Probes, Em/Ex: 494/506 nm) incubated in the hiPSC-CM culture medium (RPMI 1640 + B27 1 \times) for 20 min. Recordings were performed in a physiological solution (154 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 2 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 8 mM Glucose; 10 mM HEPES). Ca^{2+} images were recorded with an inverted confocal microscope (Zeiss LSM 810) equipped with a 63 \times objective (oil immersion, numerical aperture, N.A. = 1.4). Confocal images were obtained in line scan mode (i.e. $x-t$ mode, 1.24 ms per line; 512 pixels \times 5000 lines). To enable comparisons between cells, changes in the Fluo-4 fluorescence signal (ΔF) were normalised by basal fluorescence (F_0). All data were extracted using AIM 4.2 (Zeiss). Maximal amplitudes and event frequencies were extracted and analysed from raw data by in-house developed algorithm implemented in Python

(version 3.0) (<https://asalykin.github.io/PeakInspector/>) and Prism (GraphPad). Sparks events were analysed using the imageJ plug-in SparkMaster (<https://sites.google.com/site/sparkmasterhome/>).

2.12 | Zebrafish strains and husbandry: Morpholinos and injections

Zebrafish were maintained under standardised conditions and experiments were conducted in accordance with the European Communities council directive 2010/63.

Morpholino oligonucleotides (MOs) were obtained from Gene Tools (Philomath, OR, USA) and injected into SAT wild-type one-cell stage embryos.

The *dsc2l* ATG-MO morpholino targets the start codon of *dsc2l*. The *dsc2l* splice-MO2 targets the exon2/intron2 splice site of *dsc2l*.

The sequences of the injected MOs are the following: *dsc2l* ATG-MO – 5'-GAGTTCTCATGCCATTGAA GTCTAC-3' (10 ng); *dsc2l* splice-MO – 5'-AACCAAA CATTCTCCGCACCTTGA-3' (5 ng).

For rescue experiments, total mRNAs were extracted from human iPS-derived cardiomyocytes using Trizol®. *DSC2* cDNAs were cloned into pGem-T Easy (Invitrogen) and human *DSC2* mRNAs were synthesised using mMesage mMachine (Ambion).

2.13 | Zebrafish's cardiovascular parameters analysis

To determine cardiovascular parameters, we used μ ZebraLab™ software from ViewPoint, which has been developed specifically for this purpose. All experiments were performed as described previously.²⁸ To determine the mean blood flow, the average of the blood flow values was calculated from a 30-s time frame (3900 frames). Stroke volume was calculated by dividing the average blood flow (nL/s) by the heart beat per second (BPM/60). To assess heart contractility, movies were recorded at 120 fps and measurements were made using ImageJ software. Data were collected from three different experiments (four to 12 embryos per experiments).

2.14 | Data analysis and statistics

The electrophysiological results were analysed using Clampfit (pCLAMP v10.0; Molecular Devices) and custom-written MATLAB programs (The MathWorks Inc.). The contractile function was analysed using custom-written MATLAB programs. The confocal microscopic results

were analysed using ImageJ and custom-written MATLAB programs.

A normality test (Agostino and Pearson omnibus normality test) was always used to determine whether data follow a normal distribution. In most of cases, the normality test failed indicating a nonnormal distribution. In such cases, data are expressed as median (lower 95% confidence interval/upper 95% confidence interval). When specifically stated, results are expressed as means \pm SEM. When indicated, for comparing two conditions, a parametric or nonparametric *t*-test was performed using GraphPad prism software (GraphPad Software, Inc.). When indicated, for comparing more than two conditions with non-normal distribution, a nonparametric Kruskal–Wallis test (with Dunn's correction for multiple comparisons) was performed using GraphPad prism software. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) or $p < 0.0001$ (****).

3 | RESULTS

3.1 | Patient history

Heart samples were obtained from two Caucasian patients. A control heart was obtained from a 48-year-old patient with no family history of cardiac disease. This heart was initially meant for heart transplant, but due to technical issue, transplant was cancelled. A diseased heart was obtained from the index patient with ACM diagnosed at 41 years of age (Figure 1). This patient had been resuscitated from sudden cardiac death after an episode of VT, leading to the implantation of a cardiac defibrillator at age 50. The right ventricle (RV) ejection fraction was severely depressed. The patient suffered from various ventricular arrhythmias such as premature ventricular complexes. The ECG recapitulated many criterions from the ACM task force criteria.²⁴ In this example, the patient was in sinus rhythm with a PR interval at 160 ms, QRS interval at 120 ms and S wave slurring. Negative T waves were observed in V2 through V5 (Figure 1B). The patient underwent heart transplantation at age 66. The family history was negative for cardiomyopathy, but the patient's only son refused to be clinically tested (Figure 1C). Macroscopic observation of the ACM patient's heart showed an enlargement of the RV (Figure 1A, upper panel). The myocardial layers were replaced by fibro-fatty tissue, mainly in the RV (Figure 1A). There were abundant lymphocytes but no neutrophils in both the subendocardium and subepicardium. Extensive mutilating fibrosis and myocardial necrosis were also present (Figure 1A, bottom panel).

A heterozygous missense mutation (c.394C>T) in exon 3 of the *DSC2* gene (NM_024422.6:c.394C>T[p.Arg132Cys],

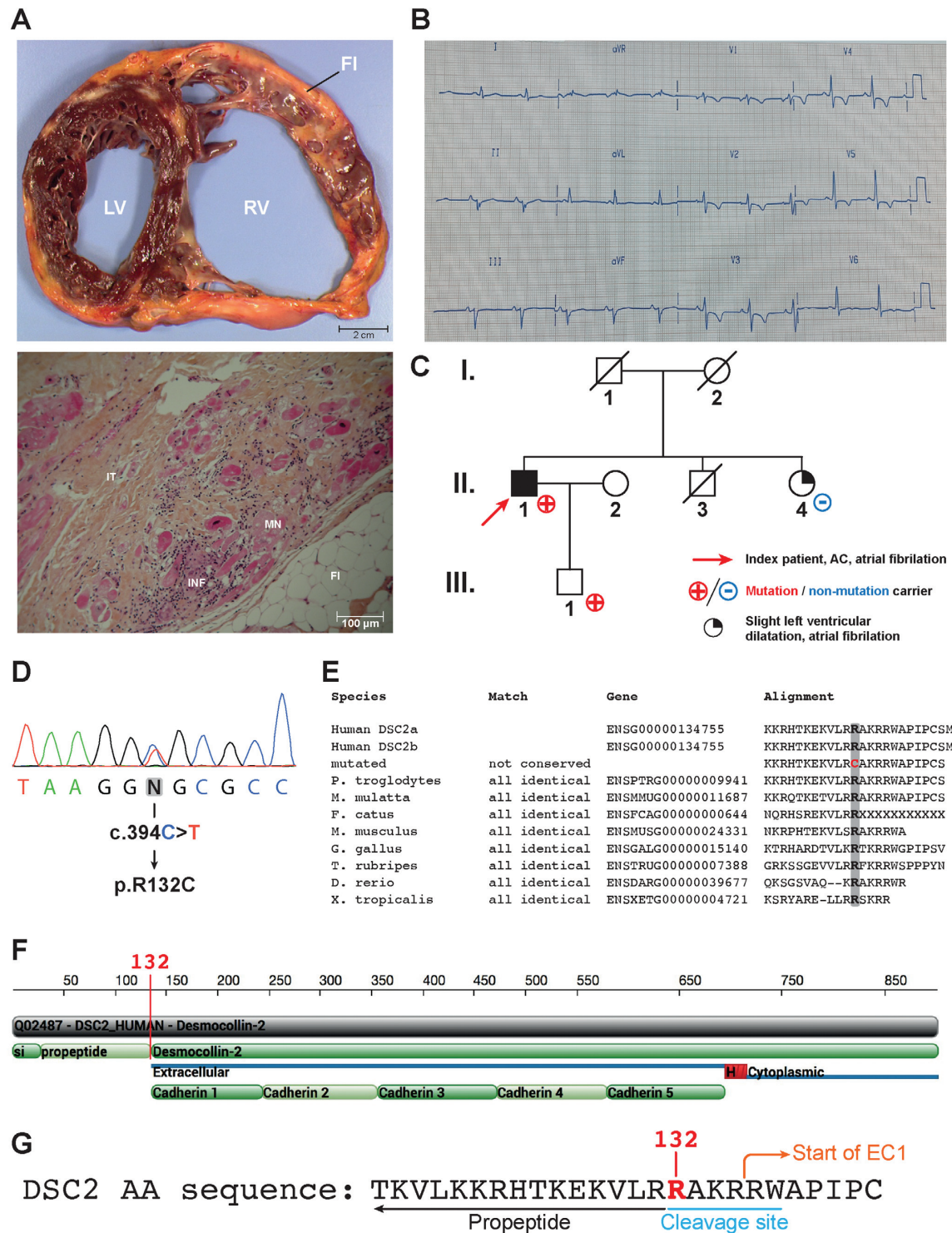


FIGURE 1 Clinical presentation. (A) Upper panel: transverse section of the ACM patient's explanted heart. The right ventricle (RV) is dilated. Adipo-fibrotic replacement of the myocardium is also observed. Lower panel: Microscopic section of the patient's explanted heart stained with hematoxylin, eosin and safran. Inflammation, adipose tissue and myocardial necrosis are observed. IT, interstitial tissue; INF,

genomic location NC_000018.10:g.31091108G>A) (Figures 1C and 1D) coding for amino acid replacement of arginine by cysteine at position 132 was identified. This variant affected the *DSC2a* and *DSC2b* genes (Figure 1D–G). Its allele frequency was estimated at 3.3×10^{-5} in the ExAC database and 3.5×10^{-5} in gnomAD database (single-nucleotide variant: 18-28671071-G-A). This variant was identified in a Japanese proband with ACM diagnosed at 15 years of age.²⁹ No mutations were found in the *RYR2*, *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *JUP* or *CASQ2* genes in the patient in our study.

3.2 | The DSC2/R132C substitution affects zebrafish heart function

We used the zebrafish model to validate the effect of the DSC2 p.R132C substitution *in-vivo*. Two morpholinos were designed against the *DSC2* zebrafish orthologue *dsc2l* (ENSDARG00000039677), targeting either the start codon (ATG-MO) or the exon2/intron2 splice site of *dsc2l* (splice-MO). At 3 days post-fertilization, ATG-MO morphant larvae showed cardiac oedema associated with blood accumulation around the yolk sac, as previously described.⁹ The same phenotype was observed in embryos that received the splice-MO (Figures 2A and 2A').

We analysed several physiological parameters using the ViewPoint ZebraBlood system. The heart rate was not affected when *dsc2l* was knocked down (Figure 2B; Table S1). However, both ATG and splice *dsc2l* morphants exhibited decreased stroke volumes (Figure 2C; Table S1). Because human patients with *DSC2* mutations harbour defects in RV contractility, we analysed and compared high-speed video recordings of wild-type un-injected embryos and *dsc2l* morphants. Ventricular contraction was significantly decreased in both ATG and splice morphants compared with wild-type embryos, similar to a previously published report (Figures 2D and 2E; Table S1 and Movies S1–S3).⁹

By adopting the same strategy as Heusser et al., we sought to determine whether the R132C substitution affected DCS2 protein function. First, we attempted to rescue the morphant phenotype using full-length human

DCS2 mRNA. Co-injection of the *dsc2l* splice-MO with 100 pg of control DCS2 mRNA significantly rescued the stroke volume and ventricle defects observed in *dsc2l* morphants (Figure 2C–E; Table S1). We performed the same experiment using the mutated human mRNA encoding the R132C substitution. Unlike the wild-type mRNA, the mutated mRNA failed to rescue the cardiovascular phenotype, indicating that the R132C substitution impairs DSC2 function *in-vivo* (Figure 2C–E; Table S1).

3.3 | Molecular and cellular impairment of ACM heart and hiPSC-CM

From heart samples, when compared with mRNA from the control RV, that from the patient's explanted RV revealed down-regulation of desmosomal genes including *DSC2*, *DSG2*, *PKP2*, *DSP* and *JUP* (Figure S1A–E). The percentage difference in the *DSC2* and *JUP* mRNA levels measured in control and patient's hiPSC-CM was highly similar to that quantified in the control versus patient heart samples (Figure S1F). Immunolabelling of control and patient heart samples showed that the aligned-fibre organization was partially lost in the patient heart (Figures S1G and S1H). Plakoglobin (*JUP*) immunostaining was reduced in the patient heart sample (Figure S1H). Consistent with lower *DSC2* mRNA levels in both the patient heart and the patient-derived hiPSC-CM, western blot experiments from patient explanted heart samples confirmed the lower DSC2 protein expression level (Figure S1I). Furthermore, in patient's hiPSC-CM immunostaining showed decreased DSC2 labelling and a loss of the membrane enrichment when compared to control hiPSC-CM (Figure S1J). In hiPSC-CM, sarcomeric organization was affected, with a partial loss of sarcomere formation (Figure S1K). The fractional area staining positive for ventricular myosin light chain 2 (MLC2v) was reduced in the patient hiPSC-CM relative to the control (Figures S2A and S2B). The patient hiPSC-CM also demonstrated a lower level of striation when compared with the control hiPSC-CM (Figure S2C–E), consistent with the decreased organization observed in the patient's heart sections.

inflammation; FI, adipose tissue; MN, myocardial necrosis. (B) Twelve-lead surface ECG illustrating the patient's electrical profile. The patient was in sinus rhythm with a PR interval at 160 ms, QRS interval at 120 ms and S wave slurring. Negative T waves were observed in V2 through V5. (C) Family pedigree. The index patient (II.1) is indicated by a red arrow. Individuals indicated with a red cross carry the mutation (II-1 and III-1). (D) Electropherogram of the patient's DNA showing the *DSC2* mutation responsible for the R132C substitution. (E) Multispecies protein sequence alignment illustrating the high degree of conservation of the arginine at position 132 (highlighted in grey). (F) Two-dimensional schematic of the DSC2 protein sequence showing the propeptide and cleavage site. Arginine 132 is located at the junction of the propeptide and the mature protein. (G) DSC2 protein sequence illustrating the location of arginine 132 within the cleavage site. Cleavage activates desmocollin's adhesive properties

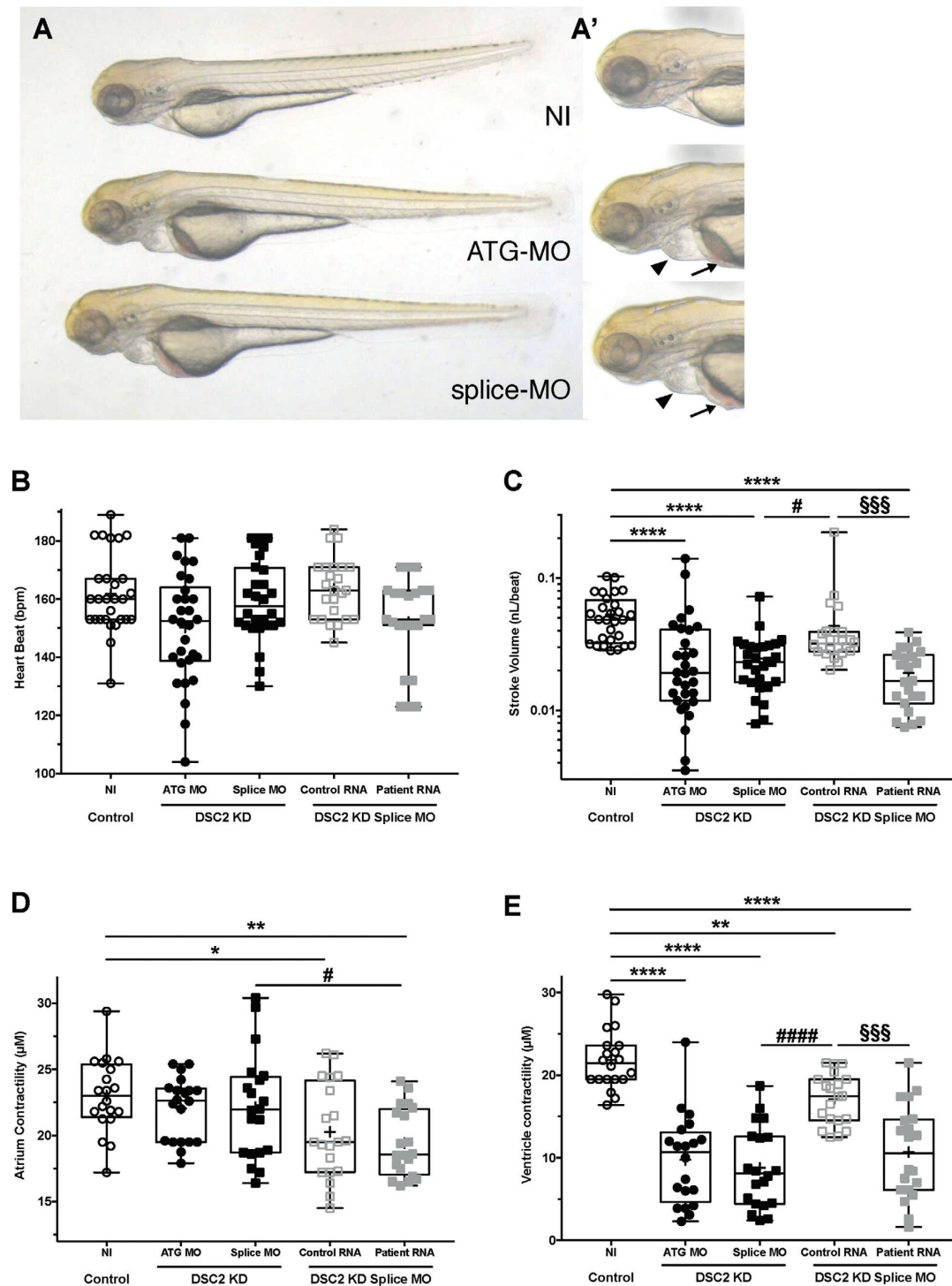


FIGURE 2 In vivo effect of DSC2 knockdown and mutation. (A) Bright-field images of noninjected (NI), *dsc2l* ATG- and splice-MO-injected fish. (A') The same larvae at higher magnification. Both morphants display cardiac oedema (black arrowheads) and blood accumulation (black arrows). (B) Box plot depicting the average heart rate in beats per minute of non-injected (NI, $N = 28$) and *dsc2l* ATG- ($N = 30$),

3.4 | DSC2 patient hiPSC-CM demonstrate altered contractile properties

The contractile function of control and patient hiPSC-CM monolayers under physiological conditions (37°C, 5% CO₂) was assessed using video analysis (Figure 3; Table S2). After 60 days of differentiation, patient hiPSC-CM demonstrated an increased beating rate (Figure 3B; Table S2). The cellular displacement (amplitude) was higher in the ACM patient cells relative to the control cells (Figure 3C; Table S2). The maximal contraction slope (contraction velocity) was similar in the control and ACM patient cells (Figure 3D; Table S2). The contraction duration (the time from peak contraction to 90% relaxation) was reduced in the ACM hiPSC-CM monolayers. After correction with Bazett's formula, to account for the difference in beating rates, contraction duration was still reduced in ACM patient cells (Figure 3E; Table S2). The median area under the curve or the median time spent in the resting position did not differ between conditions (Figures 3F and 3G; Table S2). Videos recorded from ACM patient monolayers displayed more aberrant events than the control (35% vs. 25% of the cases, respectively) (Figure 3H; Table S2).

We quantified aberrant events such as changes in the contraction rhythm, and 'early or delayed after-contraction'-like events. Each video was split and recorded as multiple areas beating simultaneously. The percentage of the total area experiencing aberrant events was higher in patient-derived monolayers (Figure 3I; Table S2). Similarly, the time fraction of each area spent in asynchrony was also increased for ACM patient cells (Figure 3J; Table S2).

3.5 | DSC2 patient hiPSC-CM demonstrate altered electrical activity

We used the patch clamp technique to measure spontaneous APs from control ($N = 41$) and ACM patient-derived

($N = 45$) single hiPSC-CM after 60 days of differentiation. We analysed the spontaneous AP rate, the maximum upstroke velocity (dV/dt_{\max}), the maximum diastolic potential and the amplitude and the AP duration (APD_{20/50/90}) with or without Bazett's formula correction. Results are displayed in Figure 4 and Table S3. APs were also evoked at a fixed pacing rate of 1 Hz, which confirmed these results (Figures S4; Table S4).

The AP maximal upstroke velocity was not affected but the patient-derived hiPSC-CM demonstrated a reduced I_{Na} density (Figures S5A–C and S6; Table S5). The depolarizing Ca²⁺ channel current, here carried by Ba²⁺ ions to minimise Ca²⁺-dependent effects, was reduced relative to the control (Figures S5D–F and 6; Table S5). The repolarizing I_{K} current was increased, likely accounting for the reduced APD in patient hiPSC-CM (Figure S5G–I; Table S5).

3.6 | DSC2 patient hiPSC-CM demonstrate altered calcium handling

The Ca²⁺ handling properties of spontaneously beating hiPSC-CM from control ($N = 362$) and patient-derived ($N = 373$) cells were assessed after 60 days of differentiation using the Fluo-4 non-ratiometric Ca²⁺-sensitive dye. Consistent with both the contractile and the electrical phenotypes, the patient-derived cells demonstrated an increased frequency of spontaneous Ca²⁺ transients (Figure 5; Table S6). Although the transient rising phase speed (dF/dt_{\max}) was not different in patient hiPSC-CM, the normalised amplitude, the transient decay duration and the area under the curve were reduced relative to the control cell values (Figure 5; Table S6).

Ca²⁺ sparks, as an indicator of ryanodine receptor 2 functional activity, were also assessed. Patient cells demonstrated an increased spontaneous frequency of aberrant Ca²⁺ events (Figure 5; Table S6), and these sparks were also shorter, as illustrated by the reduced full-duration half maximum (Figure 5; Table S6).

splice-morphant ($N = 28$) larvae and larvae co-injected with *dsc2l* splice MO and human *DSC2* wild-type mRNA ($N = 24$) or mutated mRNA ($N = 23$). (C) Box plot depicting the average stroke volume in nanolitres per beat of non-injected (NI, $n = 28$), *dsc2l* ATG- ($N = 30$), splice-morphants ($N = 28$) and larvae co-injected with *dsc2l* splice MO and human *DSC2* wild-type mRNA ($N = 24$) or mutated mRNA ($N = 23$). (D) Box plot depicting the average atrial contractile distance in micrometres (μm) of non-injected (NI, $N = 22$) and *dsc2l* ATG- ($N = 20$) and splice-morphants ($N = 20$), and larvae co-injected with *dsc2l* splice-MO and human *DSC2* wild-type mRNA ($N = 20$) or mutated mRNA ($N = 20$). (E) Box plot depicting the average ventricular contractile distance in micrometres (μm) of non-injected (NI, $N = 22$), *dsc2l* ATG- ($N = 20$), splice-morphants ($N = 20$) and larvae co-injected with *dsc2l* splice-MO and human *DSC2* wild-type mRNA ($N = 20$) or mutated mRNA ($N = 20$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ (Kruskal–Wallis test). “*” indicates a value significantly different from that for the non-injected, “#” indicates a value significantly different from that for the *dsc2l* splice-MO, and “§” indicates a value significantly different from that for the larvae co-injected with *dsc2l* splice-MO and human *DSC2* wild-type mRNA

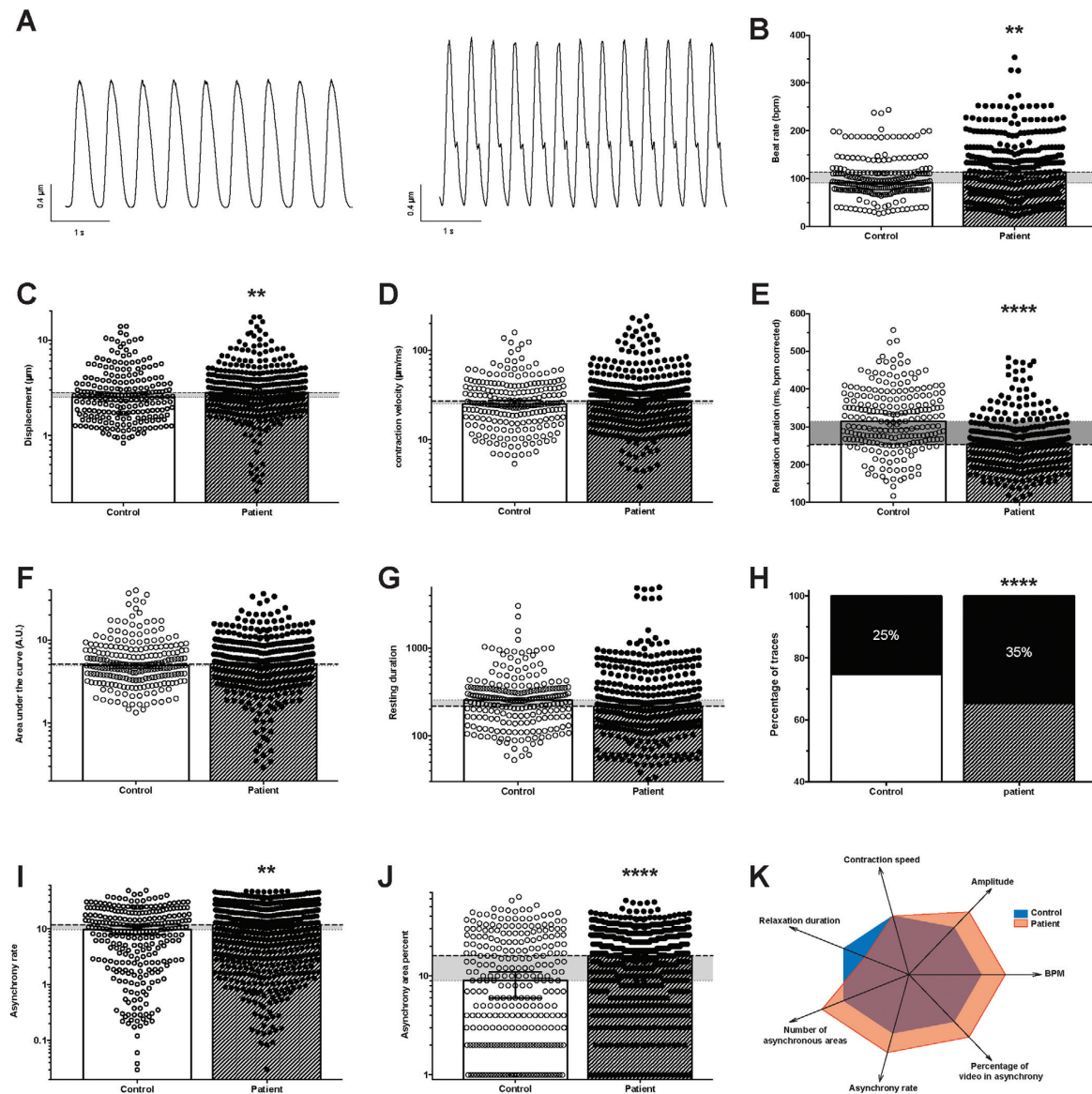


FIGURE 3 Evaluation of control and patient-specific hiPSC-CM spontaneous contractile function by video microscopy. (A) Contraction cycles from phase-contrast videos of control (left) and patient-specific (right) hiPSC-CM monolayers obtained using custom made software analysis. (B–J) Contraction characteristics of control ($N = 229$) and patient-specific monolayers ($N = 359$). (B) Beat rate, (C) cellular displacement, (D) contraction velocity, (E) contraction duration from peak to 90% relaxation corrected with Bazett's formula, (F) area under the curve, (G) resting duration, (H) the percentage of videos demonstrating aberrant contractile events (control: 25% (278 areas out of 1097 total areas); patient specific: 35% (600 areas out of 1727 total areas)), (I) the percentage of recording spent in asynchrony and (J) the percentage of the video area concerned by aberrant events. (K) Spider chart illustrating the main differences observed between control (blue area) and patient-specific (orange area) hiPSC-CM. A "normal" value of 2 is attributed to the control parameter. Each evaluated parameter is compared to the control condition and fixed as higher (3) or lower (1) if statistically significantly different. Histograms represent the median (95% confidence interval). The horizontal grey area illustrates the difference between the control and the patient specific conditions. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. Mann–Whitney test except for (H), Fisher's exact test

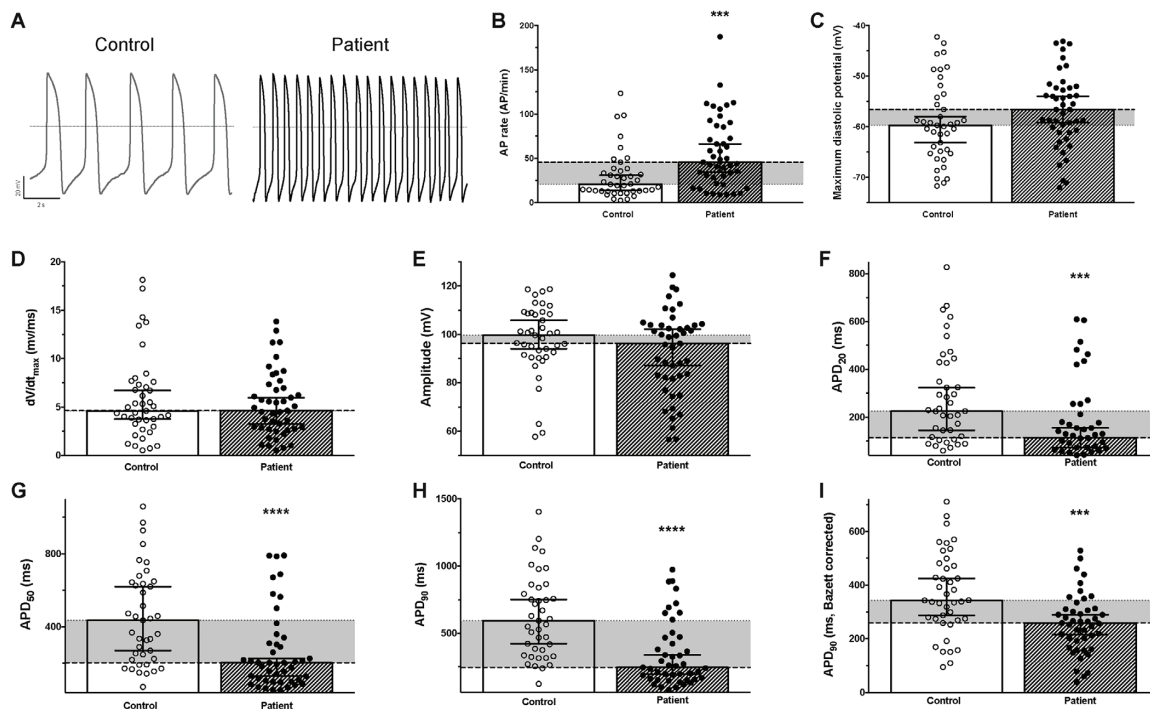


FIGURE 4 Spontaneous electrical activity of control and patient-specific hiPSC-CM. (A) Raw traces illustrating the recording of spontaneous electrical activity (action potentials, AP) of control (left) and patient-specific (right) hiPSC-CM. (B–I) AP parameters were evaluated for both control ($N = 41$) and ACM patient-specific ($N = 45$) hiPSC-CM: (B) AP rate, (C) maximum diastolic potential, (D) maximum depolarization slope, (E) AP Amplitude, (F) AP duration at 20% of repolarization (APD_{20}), (G) APD_{50} , (H) APD_{90} and (I) the APD_{90} corrected using Bazett's formula. Histograms represent the median (95% confidence interval). The horizontal grey area illustrates the difference between the control and the patient-specific conditions. *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ (Mann–Whitney test)

3.7 | Electrical and contractile disturbances and AADs

The sodium channel blocker flecainide ($1 \mu\text{M}$) was used to study the Ca^{2+} handling properties in patient hiPSC-CM differentiated for 60 days ($N = 331$; Figure S7). Flecainide ($1 \mu\text{M}$) normalised the frequency of spontaneous Ca^{2+} transients to control values, with the normalised amplitude (F/F_0) and the area under the curve qualitatively representing the amount of Ca^{2+} mobilised during a Ca^{2+} transient (Figures S7A, S7C and S7E; Table S6). A lower percentage of hiPSC-CM demonstrated Ca^{2+} sparks in the presence of flecainide (Figure S7F; Table S6), whereas no specific benefits have been observed on their properties (frequency, full-width half maximum, full-duration half maximum; Figure S7F and Table S6).

We assessed the effect of $20 \mu\text{M}$ sotalol on ACM patient-derived hiPSC-CM ($N = 75$; Figure S8). Sotalol treatment of ACM patient-derived hiPSC-CM partly normalised the AP rate (Figure S8A; Table S3). The maximum diastolic

potential, dV/dt_{max} and AP amplitude values were similar to those of the untreated cells (Figures S8B and S8C; Table S3). Sotalol treatment corrected the APD_{20} , APD_{50} and APD_{90} (Figure S8D–F; Table S3). Bazett's correction for the AP rate difference confirmed the APD_{90} normalization (Figure S8G; Table S3). Sotalol also normalised the percentage of recorded cells (28%) demonstrating abnormal electrical events (Figure S8H; Table S3). To confirm the involvement of K^+ channel blockade, we used the specific E-4031 ($1 \mu\text{M}$) blocker confirming an AP lengthening due to K^+ channel blockade (Figure S9; Table S4). Sotalol normalised the spontaneous beating rate in hiPSC-CM (Figure S10D; Table S2). This normalization was accompanied by a clear reduction in the number of abnormal contractile events (Figure S10G; Table S2). Similarly, the percentage of the total area experiencing aberrant events and the time fraction of each area in asynchrony were normalised by sotalol (Figures S10H and S10I; Table S2). In similar experiments, propranolol did not reproduce most of the effects observed with sotalol (Figure S10K; Table S2).

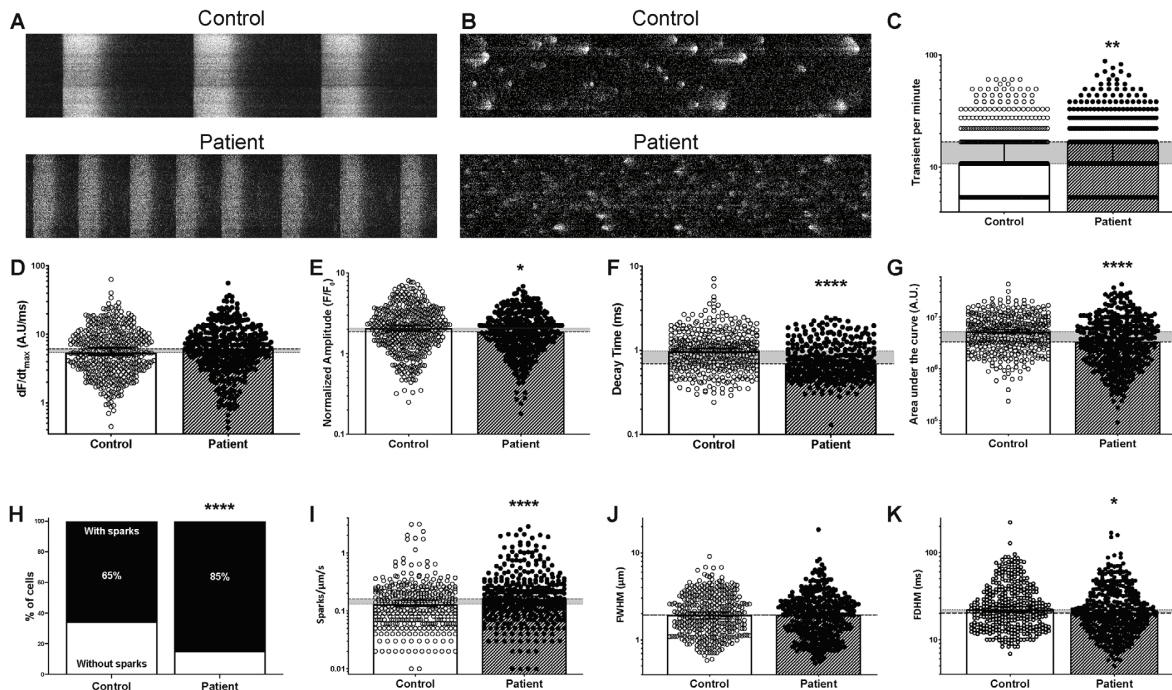


FIGURE 5 Spontaneous calcium dynamics of control and patient-specific hiPSC-CM. (A) Typical line-scan confocal images (5000 lines, 1.24 ms/line, 1×512 pixels) of calcium transients in Fluo-4 non-ratiometric fluorescent probe-loaded control (top) and patient-specific (bottom) hiPSC-CM. (B) The global transient activity was removed from the original image to keep only diastolic Ca^{2+} activity (sparks). (C–K). Both the Ca^{2+} transient activity (control $N = 325$ cells; patient $N = 357$ cells) and the sparks (control $N = 362$ cells; patient $N = 373$ cells) were studied: transient per minutes (C), maximum rising fluorescence slope (D), normalised amplitude (E), transient decay duration (F), area under the curve (G), the percentage of cells with Ca^{2+} sparks (control: 65% (362 out of 553); patient specific: 85% (373 out of 441)) (H), in each cell with sparks, their frequency (I), sparks full width at half maximum (J) and sparks full duration half maximum (K). Histograms represent the median (95% confidence interval). The horizontal grey area illustrates the difference between the control and the patient specific conditions. * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$ (Mann–Whitney test, except for (H) where Fisher’s exact test was used)

This approach was reproduced with four AADs: flecainide, propranolol, sotalol and verapamil (Figure S11). A stepwise, generalised linear model was used to calculate a novel parameter we named ‘differentiating factor’ for each analysed video (Figure S11). This parameter reflects the linear combination of determinant contractile properties ensuring the best discrimination between the control and the patient-specific condition. Once the linear combination has been identified, it is applied to the patient plus treatment condition to evaluate the treatment benefit (Figure S11B).

3.8 | ACM as a repolarization disorder disease

The 15-year patient follow-up allowed us to evaluate the QT and QRS intervals on surface ECGs. The QRS duration was stable for 5 years at 120 ms and increased to 150 ms dur-

ing follow-up (Figure S12). Although QRS lengthening is expected to reflect directly on the QTc duration, the patient QTc decreased strikingly, revealing JT-segment shortening with disease progression (Figure S12).

The ECG parameters for 79 ACM patients and 30 control individuals were studied (Figure 6; Table S7). For both healthy individuals and ACM patients, the QRS duration did not depend on the QT duration (Figure 6A). Plotting the corrected QT duration against the QRS duration revealed an ACM patient sub-population with short JT durations, and these were mostly patients with a reduced QTc (Figure 6B). However, the unspecific pattern regarding the QRS duration was noticeable in this sub-population (Figure 6B). Similarly, the evaluation of QT/QTc dependency on heart rate revealed that the patients with short JT duration were all characterised by low heart rates. This suggests abnormal QT dynamicity, specifically at reduced heart rate (Figures 6C and 6D). The QTc interval of ACM patients did not differ from controls (controls: $69 (\pm 63/74)$

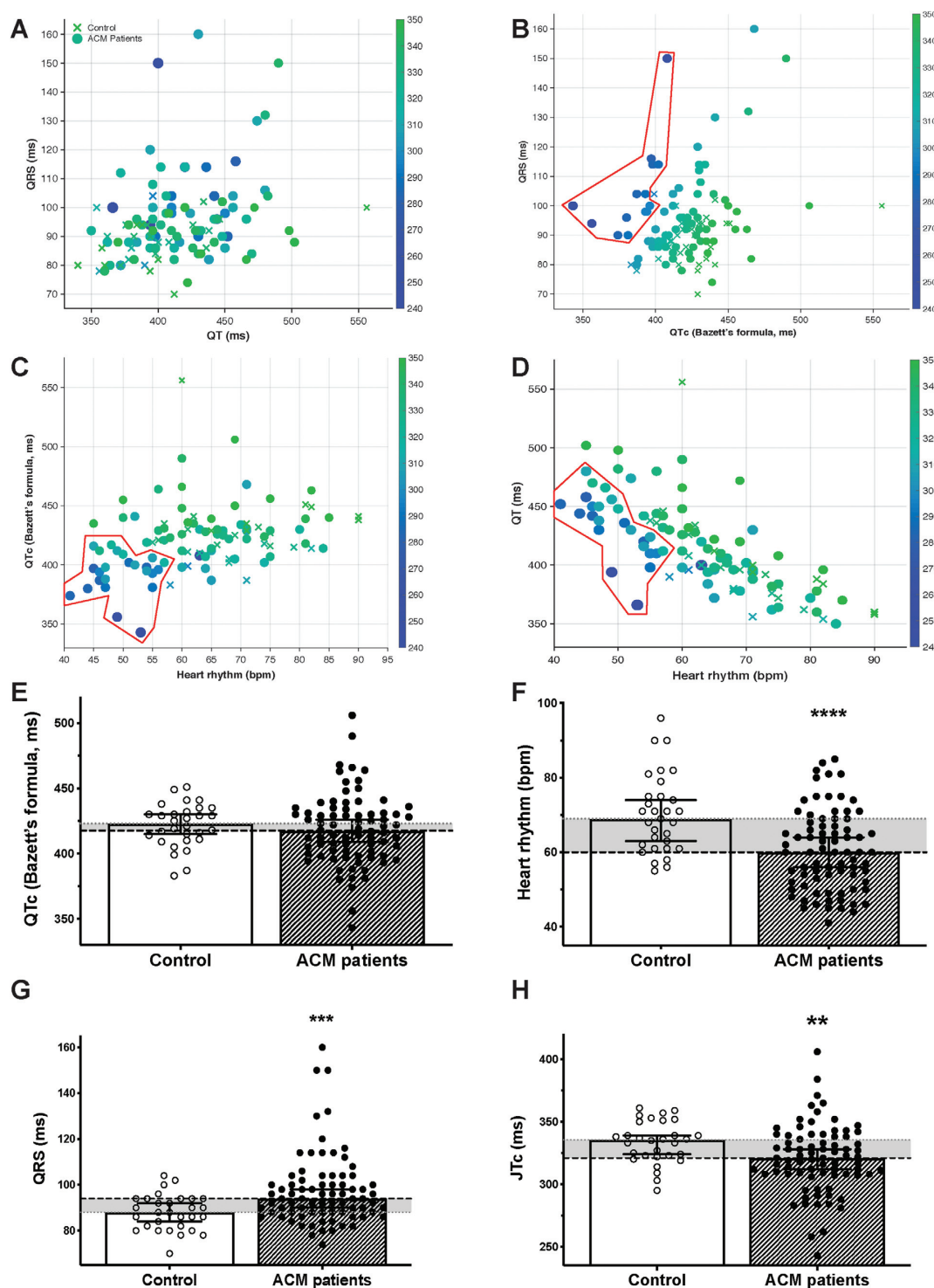


FIGURE 6 ECG parameters of an ACM cohort. ECG parameters and interdependence in a cohort of control ($N = 30$) versus ACM ($N = 79$) individuals, regardless of their age, genetic variation or treatments. (A–D) Control individuals are represented as crosses and ACM patients as circles. The symbols size (bigger symbols if JTc is longer) and colour both rely on the JTc duration (ms, colour scale indicated on the right of

bpm; patients: $60 (\pm 56/74)$ bpm) (Figures 6E and 6F). The QTc was similar but the QRS duration was increased in ACM patients (controls: $88 (\pm 84/92)$ ms; patients: $94 (\pm 90/98)$ ms), with a shorter JTc duration (controls: $335.5 (\pm 324/339)$ ms; patients: $321.5 (\pm 314/328)$ ms) (Figures 6G and 6H).

The cycle-length effect was evaluated on the hiPSC-CM model through both elicited and spontaneous AP (Figure S13). Although the APD_{90} was already shorter in ACM hiPSC-CM, these patient-specific hiPSC-CM revealed significant abnormal AP dynamics at low stimulation frequencies (Figures S13A and S13B). These results were confirmed by plotting the spontaneous period between APs against the APD_{90} for control and patient-derived cells (Figure S13C). A shorter APD for ACM patient hiPSC-CM with a low spontaneous AP firing rate was found (Figure S13C).

4 | DISCUSSION

In this study, the pathogenicity of the *DSC2* p.R132C substitution was confirmed in the zebrafish model. The use of hiPSC-CM derived from the *DSC2* patient demonstrated that (1) arrhythmias constitute a direct pathological mechanism and are not a consequence of tissue remodelling during disease progression; (2) both electrical activity and Ca^{2+} handling are impaired, leading to contractile dysfunction; and (3) AP duration was shortened, revealing repolarization issues in many ACM patients' ECGs. Finally, our data establish a rationale for the use of AADs in ACM patients.

4.1 | *DSC2*/R132C as a disease-causing substitution

Desmosomes are mainly found in organs exposed to frequent mechanical stress such as skin and heart.³⁰ Gehmlich et al. identified two *DSC2* missense mutations (encoding R203C and T275M) causing altered proteolytic cleavage.⁷ The *DSC2*/R132 residue is the first arginine of the protease recognition site. Its replacement by a cysteine might prevent proteolysis, resulting in an inactive desmocollin. Interestingly, data from both the patient's heart and

hiPSC-CM revealed that the *DSC2*/R132C substitution not only converts desmocollin to a non-adherent protein but also induces a marked loss of *DSC2* mRNA expression.

The zebrafish larva has been used to model the pathogenicity of *DSC2* variants linked to ACM at the organ level.^{9,31} Knockdown of the native fish *dsc2* enabled the study of cardiac behaviour in the setting of control or patient-specific *DSC2* expression. This model confirmed the specific pathogenicity of the *DSC2*/R132C substitution.

4.2 | ACM: A myogenic electrical disease?

Fibro-fatty replacement, a hallmark of ACM, was thought to be the main pro-arrhythmogenic mechanism in this disease. Few studies have focused on the electrical features of ACM cardiomyocytes.^{3,32,33} We found a shortened AP, explained by both an increased density of the voltage-gated K^+ current and a decreased density of the voltage-gated Ca^{2+} current. The increase in K^+ current density was consistent with recent findings using hiPSC-CM derived from a *DSG2* patient, yet the AP duration was unmodified in that study.³⁴

Using video analysis, we found an increased spontaneous beating rate, which was confirmed with the finding of a higher rate of spontaneous AP firing. This was somewhat surprising, because the observed reduced Na^+ current density, in agreement with previous reports, would favour rather a lower cellular excitability.^{34,35} The spontaneous increase in cellular excitability could rely on β -adrenergic pathway basal overactivity. This is suggested by the decrease in beating rate caused by both sotalol and propranolol. Although propranolol reduced the spontaneous hiPSC-CM beating rate, it failed to correct contraction duration and contractile aberrant events. This would thus indicate that as sotalol, propranolol is efficient to correct the β -adrenergic over-activity in the patient-specific model, but that this overactivity is not mainly responsible for aberrant contractile events. Such an increase in cellular excitability may also result from altered Ca^{2+} -handling dynamics. The ryanodine receptor (RyR2) is a Ca^{2+} channel located at the surface of the sarcoplasmic reticulum. It is responsible for the massive intracellular Ca^{2+} release that triggers the Ca^{2+} transient supporting the contraction. Although they are very rare, RyR2 genetic variants

each plot). (A) The QRS duration is plotted as a function of the QT duration. (B) The QRS duration is plotted as a function of the QTc duration (Bazett's formula corrected). (C) The QTc duration (Bazett's formula corrected) is plotted as a function of the heart rate. (D) The QT duration is plotted as a function of the heart rate. (E–H) Recapitulative histograms depicting the control and ACM patient's ECG parameters: the QTc duration (Bazett's formula corrected) (E), the heart rhythm (F), the QRS duration (G) and the JTc duration (H). Histograms represent the median (95% confidence interval). The horizontal grey area illustrates the difference between the control and the patient parameters. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$ (Mann–Whitney test)

have been identified in ACM patients, consistent with unbalanced Ca^{2+} handling in ACM.^{36–38} We determined that patient-derived hiPSC-CM exhibited both reduced global Ca^{2+} mobilization and spontaneous aberrant microscopic diastolic Ca^{2+} events likely to be involved in ACM arrhythmogenesis. This is in agreement with recent experimental data from a novel murine model with cardiac-specific, tamoxifen-triggered PKP2 deficiency: PKP2 deficiency increased RyR2-mediated Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, leading to catecholamine-induced arrhythmias.³⁹

4.3 | AAD effects: From ion channels to ECG

Studies on AAD prescription for ACM patients are lacking. In our model, hiPSC-CM mechanical properties recapitulated their electrical features and Ca^{2+} handling. The stepwise, generalised linear model identified the combination of parameters that best differentiated control from patient cell monolayer properties. Among the four tested drugs, sotalol and flecainide were clearly the most effective in normalizing hiPSC-CM properties. Clinical interest in sotalol is often reported but evidence supporting its use is sparse.^{17,40–44} Although sotalol is known to trigger torsade de pointe, this dramatic adverse effect has not been reported in ACM patients, even when sotalol has been combined with a class Ia molecule (flecainide). In the *DSC2* hiPSC-CM cells, both electrical activity and mechanical function were improved by sotalol.

Flecainide was proposed as a therapeutic to prevent diastolic Ca^{2+} waves and arrhythmias in catecholaminergic polymorphic VT.^{45–48} Here, flecainide normalised the frequency of spontaneous Ca^{2+} transients and the occurrence of Ca^{2+} sparks in *DSC2* hiPSC-CM cells, providing a rationale for its therapeutic use in ACM. Our results are in line with recently published findings of dysregulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis and effective therapy with flecainide in a PKP2-deficient mouse model.³⁹ These studies have motivated a multicentre, pilot clinical trial that the NIH recently funded (https://projectreporter.nih.gov/project_info_description.cfm?aid=9587014&icde=45130245&ddparam=&ddvalue=&ddsub=&cr=4&csb=default&cs=ASC&pball=).

4.4 | A repolarization disorder

It has been suggested that symptomatic ventricular arrhythmia begins during the electrical phase of ACM. A recent study reported two patients with apparently normal hearts presenting ventricular fibrillation in early-stage

ACM.⁴⁹ The *PKP2cKO* murine model developed by Cerone et al. supports a myogenic origin of VA in ACM patients.³⁹ The shortened APD we observed led us to identify a previously unknown abnormal repolarization dynamicity in some patients with a QT-interval not lengthening as expected at low heart rate. In most patients with ACM, right-ventricular parietal block, reduced QRS amplitude, epsilon wave, and T-wave inversion in V1-3 are present, but QT- or JT-interval dynamicity has never been looked for. A short QT interval may have been overlooked because of QRS widening and masking this abnormality, mainly at slow heart rates. In addition, ACM being an evolutive disease, short myocardial repolarization times may be obvious only during a brief time frame and may be blurred by drug treatment. The hypothesis of an increased repolarization reserve would also be strengthened by the high efficacy of sotalol in some ACM patients, and high drug dosage (320–480 vs. 160–320 mg/day) has been shown to have a greater antiarrhythmic efficacy.^{42,44} The reverse-use dependence effect of sotalol may underlie its efficacy and its safety in a setting of an increased repolarization reserve.⁵⁰ In the present case, with right-dominant ACM, the short coupling interval of the ventricular fibrillation triggered by ventricular premature beats also suggests a shortened refractory period and supports the use of QT-prolonging drugs in ACM patients.

4.5 | Study limitations

The starting point of this study was based on a single patient and a single genetic variation located on the *DSC2* gene. Although this may limit our conclusions on this single genetic variation, we also studied a cohort of ACM patients, regardless of their genetic variations. As such, the subpopulation of ACM patients with altered QT dynamicity does not exclusively harbour *DSC2* genetic variations, thus demonstrating a general process not only focused on the defect in the *DSC2* gene. Regarding RNA sequencing data, we also acknowledge a limited statistical power due to difficulties in accessing the valuable biological samples (control and patient heart samples). Although these data are not critical to the overall message, we believe that they can be valuable to other researchers within the field to compare with their own datasets. Recent gene editing technologies could be used to generate isogenic cell models. Using this technology, it is possible to compare two cell lines in which the only theoretical difference is the presence (or absence) of a patient-specific genetic variation. In our case, the use of these technologies could be used to clearly establish the pathogenicity of a genetic variation found in a patient. In our study, for this, we chose to focus on a more integrative model (i.e., zebrafish), which

allowed us to assess the specific effect of genetic variation at the level of organs and organisms.

5 | CONCLUSION

A multi-faceted functional study of a novel *DSC2* variant combining clinical, histological, zebrafish and hiPSC data helped to define ACM pathology. Patient-specific hiPSC-CM revealed major electrical disturbances with shorter APD supporting abnormal repolarization dynamicity. By normalizing the increased repolarization reserve of ACM myocytes, class 3 AADs are likely to be the first drugs prescribed for *DSC2* patients. Because flecainide normalised Ca^{2+} -related events, it may be used as a second choice or in combination with a class 3 AAD. These findings may encourage the establishment of randomised, controlled trials to evaluate class 1 or pure class 3 AADs in ACM patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Adrien Moreau  <https://orcid.org/0000-0003-3100-0807>

REFERENCES

- Basso C, Baucé B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2011;9:223-233.
- Finocchiaro G, Papadakis M, Robertus JL, et al. Etiology of sudden death in sports: insights from a United Kingdom regional registry. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:2108-2115.
- James CA, Calkins H. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: progress toward personalized management. *Annu Rev Med*. 2019;70:1-18.
- Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, et al. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982;65:384-398.
- Asimaki A, Kleber AG, Saffitz JE. Pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Can J Cardiol*. 2015;31:1313-1324.
- Groeneweg JA, Bhonsale A, James CA, et al. Clinical presentation, long-term follow-up, and outcomes of 1001 arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patients and family members. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:437-446.
- Gehmlich K, Syrris P, Peskett E, et al. Mechanistic insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by desmocollin-2 mutations. *Cardiovasc Res*. 2011;90:77-87.
- Christensen AH, Schmitz B, Andersen CB, Bundgaard H, Brand SM, Svendsen JH. Functional promoter variant in desmocollin-2 contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9:384-387.
- Heuser A, Plovie ER, Ellinor PT, et al. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2006;79:1081-1088.
- Brodehl A, Belke DD, Garnett L, et al. Transgenic mice overexpressing desmocollin-2 (*DSC2*) develop cardiomyopathy associated with myocardial inflammation and fibrotic remodeling. *PLoS ONE*. 2017;12:e0174019.
- Delmar M, McKenna WJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res*. 2010;107:700-714.
- Getsios S, Huen AC, Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:271-281.
- Green KJ, Gaudry CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:208-216.
- Remme CA, Bezzina CR. Cardiac desmosomal (dys)function and myocyte viability. *Cell Cycle*. 2010;9:1246-1252.
- Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2006;116:2012-2021.
- Iyer VR, Chin AJ. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC/D). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C:185-197.
- Sen-Chowdhry S, Morgan RD, Chambers JC, McKenna WJ. Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med*. 2010;61:233-253.
- d'Amati G, di Gioia CR, Giordano C, Gallo P. Myocyte transdifferentiation: a possible pathogenetic mechanism for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:287-290.
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11:855-860.
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8:162-175.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- Ma D, Wei H, Lu J, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2013;34:1122-1133.
- Wen JY, Wei CY, Shah K, Wong J, Wang C, Chen HS. Maturation-based model of arrhythmogenic right ventricular dysplasia using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Circ J*. 2015;79:1402-1408.
- Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J*. 2010;31:806-814.
- Fressart V, Duthoit G, Donal E, et al. Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. *Europace*. 2010;12:861-868.
- Badja C, Maleeva G, El-Yazidi C, et al. Efficient and cost-effective generation of mature neurons from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Trans Med*. 2014;3:1467-1472.
- Zhang J, Klos M, Wilson GF, et al. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res*. 2012;111:1125-1136.
- Parker T, Libourel PA, Hetheridge MJ, et al. A multi-endpoint in vivo larval zebrafish (*Danio rerio*) model for the assessment of integrated cardiovascular function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014;69:30-38.

29. Ohno S, Nagaoka I, Fukuyama M, et al. Age-dependent clinical and genetic characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circ J*. 2013;77:1534-1542.
30. Cheng X, Koch PJ. In vivo function of desmosomes. *J Dermatol*. 2004;31:171-187.
31. Giardoglou P, Beis D. On zebrafish disease models and matters of the heart. *Biomedicine*. 2019;7:15.
32. Kim C, Wong J, Wen J, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494:105-110.
33. Te Riele AS, Agullo-Pascual E, James CA, et al. Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. *Cardiovasc Res*. 2017;113:102-111.
34. El-Battrawy I, Zhao Z, Lan H, et al. Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace*. 2018;20:f46-f56.
35. Cerrone M, Lin X, Zhang M, et al. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*. 2014;129:1092-1103.
36. Austin KM, Trembley MA, Chandler SF, et al. Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:519-537.
37. Roux-Buisson N, Gandjbakhch E, Donal E, et al. Prevalence and significance of rare RYR2 variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: results of a systematic screening. *Heart Rhythm*. 2014;11:1999-2009.
38. Tiso N, Stephan DA, Nava A, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001;10:189-194.
39. Cerrone M, Montnach J, Lin X, et al. Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm. *Nat Commun*. 2017;8:106.
40. Bennett RG, Haqqani HM, Berruezo A, et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy in 2018–2019: ARVC/ALVC or both? *Heart Lung Circ*. 2019;28:164-177.
41. Ermakov S, Hoffmayer KS, Gerstenfeld EP, Scheinman MM. Combination drug therapy for patients with intractable ventricular tachycardia associated with right ventricular cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014;37:90-94.
42. Ermakov S, Scheinman M. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy - antiarrhythmic therapy. *Arrhythm Electrophysiol Rev*. 2015;4:86-89.
43. Marcus GM, Glidden DV, Polonsky B, et al. Efficacy of antiarrhythmic drugs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a report from the North American ARVC Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:609-615.
44. Wichter T, Borggreve M, Haverkamp W, Chen X, Breithardt G. Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia. *Circulation*. 1992;86:29-37.
45. Lieve KV, Wilde AA, van der Werf C. The role of flecainide in the management of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Arrhythm Electrophysiol Rev*. 2016;5:45-49.
46. Watanabe H, Chopra N, Laver D, et al. Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med*. 2009;15:380-383.
47. Hilliard FA, Steele DS, Laver D, et al. Flecainide inhibits arrhythmogenic Ca²⁺ waves by open state block of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels and reduction of Ca²⁺ spark mass. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:293-301.
48. Sikkink MB, Collins TP, Rowlands C, et al. Flecainide reduces Ca²⁺ spark and wave frequency via inhibition of the sarcolemmal sodium current. *Cardiovasc Res*. 2013;98:286-296.
49. Blom LJ, Te Riele A, Vink A, Hauer RNW, Hassink RJ. Late evolution of arrhythmogenic cardiomyopathy in patients with initial presentation as idiopathic ventricular fibrillation. *HeartRhythm Case Rep*. 2019;5:25-30.
50. Dorian P, Newman D. Rate dependence of the effect of antiarrhythmic drugs delaying cardiac repolarization: an overview. *Europace*. 2000;2:277-285.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Moreau A, Reissq J-B, Delanoe-Ayari H, et al. Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: From ion channels to ECG and tailored drug therapy. *Clin Transl Med*. 2021;11:e319. <https://doi.org/10.1002/ctm2.319>

Étude III : Implication de la voie PPAR γ dans le remodelage électrophysiologique

La CA, comme décrite précédemment, est caractérisée par le déclenchement d'arythmies, provenant d'un remodelage électrique du cardiomyocyte, ainsi qu'un remplacement fibro-adipeux du myocarde. Ce remplacement fibro-adipeux a plusieurs origines : les cellules cardiaques peuvent mourir et être remplacées soit par des cellules souches, soit par des progéniteurs cardiaques. Cependant le nombre limité de cellules souches et de progéniteurs n'explique pas complètement le remodelage structural du ventricule droit caractéristique de la CA. C'est pourquoi l'hypothèse d'une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes a été soulevée par plusieurs études (d'Amati et al. 2000; Garcia-Gras et al. 2006; D. Ma et al. 2013). Plusieurs voies de signalisation semblent être impliquées dans ces processus de remplacement fibro-adipeux ; notamment la voie Hippo et Wnt. La voie de signalisation Wnt est d'autant plus importante, car son inhibition provoque une surexpression de PPAR γ (Kim et al. 2013). PPAR γ constitue un élément central dans les processus d'adipogenèse et de lipogenèse (Rosen et al. 2002). La voie de signalisation impliquant PPAR γ semble donc être une voie clé dans le processus de transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes. Nous avons notamment étudié l'implication de cette voie dans le processus de remodelage électrophysiologique, car cela contribue fortement à l'apparition d'arythmies et au développement de la mort subite cardiaque chez le patient. Nous avons donc, pour cette étude, utilisé les mêmes hiPSC-CM que dans l'étude précédente (issus d'un patient atteint de CA présentant une mutation sur le gène DSC2) et testé les effets d'une incubation chronique de 40 jours avec un inhibiteur spécifique de PPAR γ , le T0070907 (T007), à 1 μ M.

Premièrement nous avons étudié l'expression génique de PPAR γ ainsi que deux gènes cibles (adiponectine et périlipine) par RT-qPCR. Les résultats révèlent une expression plus importante de PPAR γ , de l'adiponectine et de la périlipine dans les hiPSC-CM issus du patient par rapport aux cellules contrôles (de référence). De plus, le caractère myocytaire a été évalué par l'expression de la chaîne légère de myosine, protéine spécifiquement exprimée dans les cardiomyocytes. L'expression génique était diminuée dans les hiPSC-CM DSC2. L'incubation du T007 à 1 μ M pendant 40 jours agit comme un agoniste inverse de PPAR γ réduisant le niveau d'expression de ce gène, et par conséquent normalise les niveaux d'expressions de deux gènes cibles. Ces résultats indiquent que le T007 est un co-répresseur sélectif de PPAR γ et valident notre modèle et le temps d'incubation.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de cette inhibition de PPAR γ sur les propriétés mécaniques, électriques et calciques. Cette étude a confirmé les altérations de l'activité contractile, électrique et calcique précédemment constatée chez les cellules issues du patient. Après l'incubation de T007 pendant 40 jours, nous observons une normalisation des propriétés contractiles. En effet, l'inhibition de la surexpression de PPAR γ prévient l'augmentation de la fréquence de contractions spontanées, ainsi que d'autres propriétés contractiles comme la durée de contraction et la durée de relaxation. De plus, le pourcentage d'asynchronie était réduit avec le T007. Nous avons également testé l'incubation d'un activateur de PPAR γ , le GW1929, sur les hiPSC-CM contrôles. Sur les propriétés contractiles nous n'observons pas d'altérations fonctionnelles après l'incubation de 40 jours avec l'agoniste. Pour aller plus loin, nous avons évalués l'effet de l'inhibiteur sur les propriétés contractiles par la technique de patch-clamp. Tout d'abord, le T007 prévient le raccourcissement du PA. La normalisation de la densité des courants sodiques et potassiques a aussi été constatée, par ailleurs confirmée par RT-qPCR. Dans une approche parallèle, nous avons également incubé le T007 pendant 5 jours, de J55 à J60, afin d'évaluer l'effet du T007 à plus court terme (incubation plus courte), et après l'installation du phénotype pathologie (à partir de J55 et non J20). Cependant, nous n'observons pas de normalisation du PA avec ce temps d'incubation. Ceci suggère que l'inhibition de PPAR γ doit s'effectuer précocement pour prévenir le remodelage électrique cellulaire.

L'altération calcique, notamment l'apparition de *sparks* calciques, décrite précédemment, a également été corrigée par l'incubation avec le T007 (40 jours). Ces données suggèrent que la voie PPAR γ est une voie centrale dans le remodelage électrophysiologique dans la CA. L'inhibition de la voie PPAR γ prévient ce remodelage à savoir un trouble de la repolarisation ainsi qu'une excitabilité cellulaire accrue, réduisant ainsi le risque d'arythmies. Pour finir, nous avons voulu savoir si cette inhibition était réversible. Pour cela, nous avons incubé les hiPSC-CM mutés DSC2 de la même manière jusqu'à J60, puis en enlevant l'inhibiteur entre J60 et J100. Nous avons testé la réversibilité par le biais de la mesure du PA. Nous avons observé un raccourcissement du PA entre les hiPSC-CM contrôles et mutés DSC2 à J100. De plus, la suppression du T007 entre J60 et J100 a provoqué un raccourcissement de l'APD, démontrant la réversibilité de l'inhibition. Ces effets étaient cohérents avec les caractéristiques phénotypiques pathologiques « naturelles » du DSC2 hiPSC-CM muté. Par conséquent, le maintien à la normale du PA nécessite une exposition soutenue et continue au T007 dans le milieu de culture pour empêcher les modifications dues à la variation génétique DSC2 au fil du temps.

L'étude précédente montre que l'apparition des arythmies dans la CA provient d'un remodelage électrique d'origine strictement cellulaire. Celle-ci explique également l'effet au niveau cellulaire des molécules anti-arythmique prescrit chez le patient. Cependant, ces molécules préviennent le déclenchement des arythmies et ne traitent pas le problème de base : la modification de l'expression des canaux ioniques conduisant donc à la modification des courants ioniques. Cette étude s'intéresse à la prévention précoce des changements électrophysiologiques dans le déclenchement des arythmies. Nous avons donc suivi l'hypothèse selon laquelle la voie PPAR γ serait une voie clé dans le processus de transdifférenciation. Cette voie a précédemment été décrite pour induire une adipogenèse dans d'autres modèles de la CA (Kim et al. 2013; Garcia-Gras et al. 2006). Cependant son rôle dans les changements électriques n'a jamais été investigué dans le cadre de cette pathologie. Nous avons observé dans notre modèle cellulaire de CA, une surexpression du transcrit du gène PPAR γ ainsi que de deux gènes cibles de cette voie. Ces résultats témoignent d'un potentiel transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes. De plus, l'expression d'un marqueur cardiomyocytaire (la chaîne légère de myosine) était réduite chez les cellules issues du patient. Ceci est en lien avec la MET, où nous observons une diminution nette de l'appareil contractile chez les hiPSC-CM DSC2. L'inhibition de PPAR γ , par le T007, a eu pour conséquence de normaliser ces expressions géniques. Ceci valide notre modèle d'étude et est un premier indicateur dans l'inhibition potentielle d'une transdifférenciation des hiPSC-CM. Le T007, à la concentration de 1 μ M, est un ligand spécifique de PPAR γ (Lee et al. 2002). De plus, l'effet antagoniste du T007 est plus important lors d'une surexpression de PPAR γ . En effet, plus PPAR γ est exprimé et plus l'effet du T007 sur ce gène est important (S. Ma et al. 2021). Ceci explique pourquoi d'autres études utilisent le T007 à une concentration plus importante (An et al. 2014; Ji et al. 2018).

Au niveau électrophysiologique et mécanique, le T007 a prévenu les perturbations précédemment décrites dans l'étude II. Une inhibition tardive (entre J55 et J60) ne permet pas de normaliser les propriétés électriques et mécaniques. Les perturbations électrophysiologiques étant déjà présentes, il est possible qu'il soit trop tard pour induire une normalisation de ces propriétés. Par ailleurs, il est aussi possible que 5 jours ne soient pas suffisants pour obtenir les effets bénéfiques du T007. Ceci pourrait donc indiquer que le remodelage électrique pourrait débuter à un stade précoce. Ceci est en accord avec des études cliniques décrivant l'apparition d'arythmies avant les changements structuraux chez le patient (Blom et al. 2019; Mast et al. 2017). Nous avons également testé la réversibilité de notre modèle et nous observons que le maintien de l'inhibition est obligatoire pour prévenir les changements électriques. De plus,

l'activation de PPAR γ par un agoniste n'a pas permis d'induire le même phénotype chez les hiPSC-CM contrôles. Ceci suggère donc que la modulation de la voie PPAR γ , bien que centrale dans la pathogenèse soit nécessaire mais pas suffisante pour induire le phénotype pathologique. Néanmoins, ces résultats indiquent bien que l'inhibition de PPAR γ est suffisante pour diminuer le risque d'arythmie et que cette inhibition doit être continue et précoce.

LETTER TO EDITOR

The PPAR γ pathway determines electrophysiological remodelling and arrhythmia risks in DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy

Dear Editor,

Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) is a rare, life-threatening genetic disease frequently associated with mutations in desmosomal genes.¹ Histopathological hallmark includes fibrofatty replacement of myocardial tissue, potentially consisting of cardiomyocytes transdifferentiation into adipocytes.² The ACM involves electromechanical disorders and risks of developing arrhythmias and sudden cardiac death. We recently evidenced early electrical modifications of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) obtained from an ACM patient with a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene encoding desmocollin 2 (DSC2-hiPSC-CMs). These modifications are risk factors for triggering arrhythmias independently of fibrofatty replacement of myocardial tissue.³ We now show that PPAR γ , a master regulator of the cardiomyocytes transdifferentiation into adipocytes, is critical early in the pro-arrhythmogenic pathogenesis in ACM-DSC2-hiPSC-CMs.

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of heart samples revealed a higher PPAR γ gene expression level in the ACM-heart bearing the *DSC2* mutation than in the control heart (Figure S1). We derived hiPSCs from the same ACM-DSC2 patient, differentiated them into hiPSC-CMs, and cultured them for 60 days as described.³ We found a similar higher expression of PPAR γ and of two pro-adipogenic target genes, perilipin and adiponectin, in DSC2-hiPSC-CMs versus control-hiPSC-CMs (Figure 1A–C). Despite lower expression, the pro-cardiac myosin light chain 2 ventricular (MLC2v) validated the cardiomyocyte phenotype of DSC2-hiPSC-CMs (Figure 1D). To confirm the involvement of PPAR γ in the genes switch, we challenged DSC2-hiPSC-CMs with T0070907 (T007), which functions as a transcriptionally corepressor-selective PPAR γ inverse agonist.⁴ Incubation with T007 (1 μ M), for 40 days (D20–D60) during the maturation phase, corrected the expres-

sion levels of PPAR γ , perilipin, adiponectin and MLC2v (Figure 1A–D). These results corroborated the PPAR γ -dependent pro-adipogenic switch in the DSC2-hiPSC-CMs, linking with previous studies.^{2,5,6}

We next investigated the effects of T007 on the excitation-contraction coupling using a phase-contrast video-based analysis of the hiPSC-CM monolayer's contractile function. We defined several contractile parameters: the beat rate, contraction time, relaxation duration, the resting time between two contractions, asynchronous rate and differentiating factor (Figure 2A–F). For each analysed video, the asynchronous time defines the time-fraction of the area spent in asynchrony. The differentiating factor reflects the linear combination of determinant contractile properties ensuring the best discrimination between the control-hiPSC-CMs and the DSC2-hiPSC-CMs.

The mutation increased the beat and asynchronous rates (Figure 2A,B) and reduced the contraction time, relaxation and resting duration in DSC2-hiPSC-CMs versus control-hiPSC-CMs (Figure 2C–E). Incubation with T007 prevented these modifications. The differentiating factor was similar to that of the control-hiPSC-CMs (Figure 2F), showing that PPAR γ pathway inhibition counteracts the pathogenesis process. Interestingly, the PPAR γ agonist (GW1929) did not mimic the effect of the mutation on the differentiating factor and action potential (AP) duration in control-hiPSC-CMs (Figure S2A) in line with the negligible effect of PPAR γ agonists on basal transcription.⁴ A significant PPAR γ expression level may be required for ligand-mediated effects.

In cardiomyocytes, the AP initiates the contraction. We studied the effect of T007 on the electrophysiological properties of DSC2-hiPSC-CMs using the patch-clamp technique. Compared to control-hiPSC-CMs, the DSC2-hiPSC-CMs exhibited a twofold shortening of the AP duration at 1.0 Hz and lost action potential duration (APD)

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](#) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

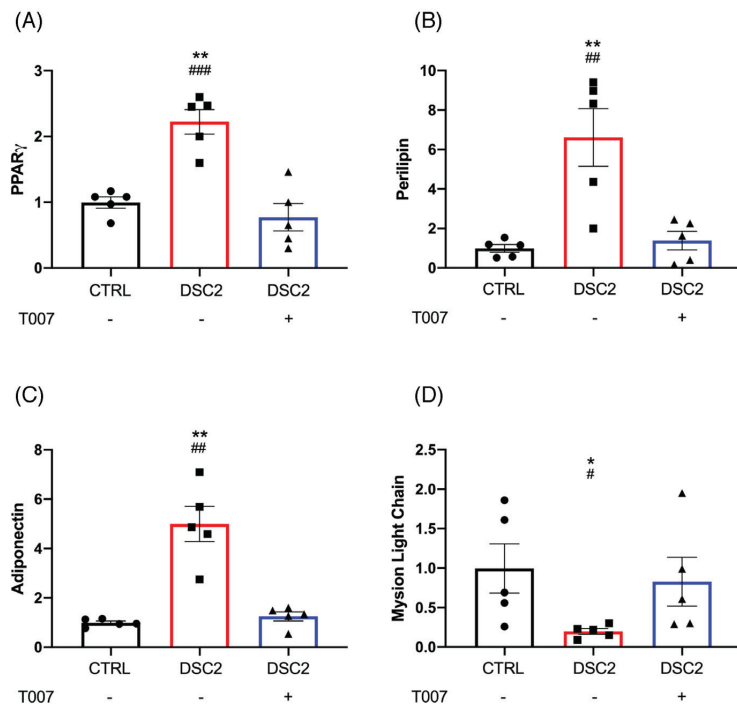


FIGURE 1 T0070907 modulates PPAR γ pathway and prevents the cardiomyocyte phenotype in DSC2 patient-specific human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM). Fold change compared to control for (A) PPAR γ , (B) perilipin, (C) adiponectin and (D) myosin light chain (MLC) expression level, measured using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Error bars represent the standard error of the mean (SEM), $N = 5/\text{group}$. *Control versus DSC2, #DSC2 versus T007; *,# $p < .05$, **,## $p < .01$, ***,### $p < .001$ (Tuckey multiple comparisons test)

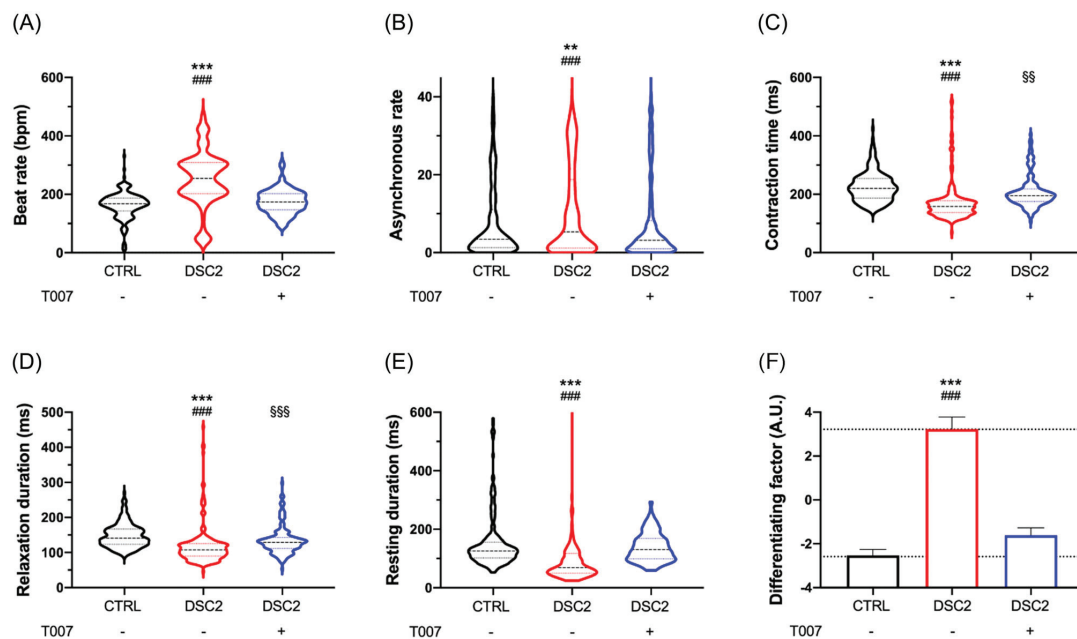


FIGURE 2 T0070907 prevents contractile disturbances in DSC2 patient-specific human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs). The contractile activity was studied by video analysis in monolayer condition (control, $N = 249$ (black); patient, $N = 212$ (red); T0070907, $N = 197$ (blue)): beat rate (A), asynchronous rate (B), contraction time (C), relaxation duration (D), resting duration (E) and differentiating factor (F). Results are represented by violin plot with the median, first and third quartile. *Control versus DSC2, #DSC2 versus T007, §§control versus T007; *,§§ $p < .01$, ***,###,§§§ $p < .001$ (Kruskal-Wallis test)

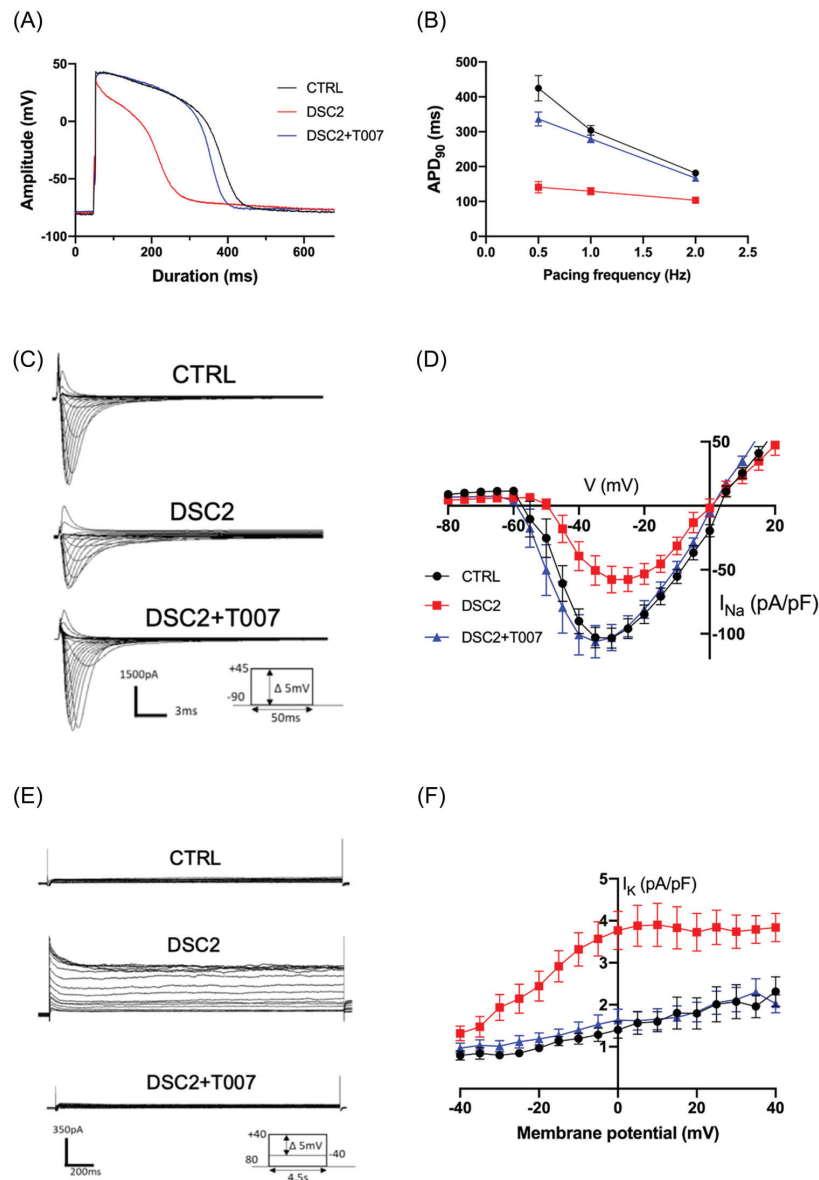


FIGURE 3 Electrical activity of control and patient-specific human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) with or without T0070907. (A) Action potentials (APs) of hiPSC-CM from control (black), DSC2 patient in absence of T0070907 (red) and after 40 days of incubation with 1 μ M of T0070907 (blue). (B) AP duration at 90% of repolarisation (APD_{90}) as a function of pacing rate (control, $N = 42$; DSC2, $N = 40$; DSC2 + T0070907, $N = 40$). (C) Whole-cell Na^+ current traces of control (top), patient-specific hiPSC-CMs (middle) and after incubation of T007 (bottom). (D) Averaged current density-voltage ($I-V$) relationship of I_{Na} (control, $N = 23$; DSC2, $N = 21$; DSC2 + T0070907, $N = 23$). (E) Whole-cell I_K currents raw traces of control (top), patient-specific (middle) and after incubation of T0070907 (bottom) hiPSC-CMs. (F) $I-V$ curves of I_K associated currents (control, $N = 15$; DSC2, $N = 18$; DSC2 + T007, $N = 14$). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). All differences are statistically different, $p < .001$, DSC2 versus control and versus DSC2 + T0070907 (Tuckey multiple comparison test)

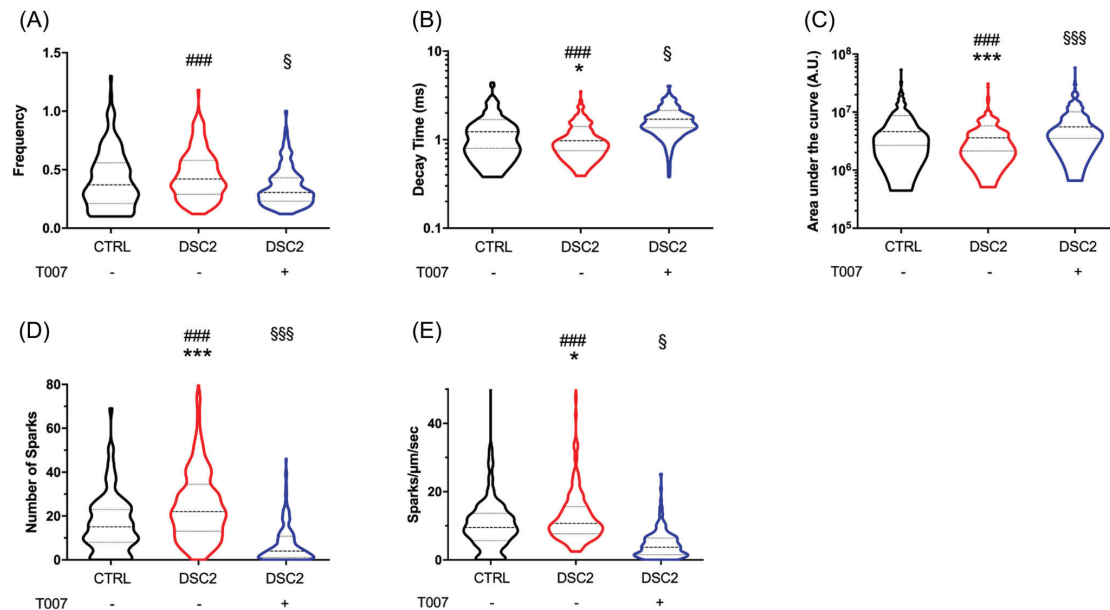


FIGURE 4 Spontaneous Ca^{2+} handlings of control, patient-specific human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) and incubated with T0070907. The Ca^{2+} transient activity (control, $N = 207$ (black); patient, $N = 222$ (red); T0070907, $N = 197$ (blue)) were studied. Spontaneous frequency (A), decay time (B) and area under the curve (AUC) (C). The Ca^{2+} sparks were studied by measuring the number of sparks in each cell (D) and the frequency of sparks (E). The violin plot represented the median, first and third quartile, and a Kruskal–Wallis test was performed. *Control versus DSC2, # DSC2 versus T007, § control versus T007; *, § $p < .05$, ***, ###, §§§ $p < .001$ (Tukey multiple comparisons test were performed)

modulation according to pacing rate (Figure 3A,B). The voltage-gated Na^+ current (I_{Na}) induces AP fast depolarisation, playing a master role in cardiac excitability. The DSC2-hiPSC-CMs exhibited a twofold decrease in I_{Na} density and a rightward shift in its voltage-dependent activation and steady-state inactivation (Figures 3C,D and S3). Consistently, the expression level of the *SCN5A* gene coding for the cardiac Na_v channels (I_{Na}) was decreased (Figure S4). Voltage-gated K^+ currents play a crucial role in AP repolarisation. Compared to control-hiPSC-CMs, DSC2-hiPSC-CMs exhibited a 3.5-fold increase in K^+ current density, accounting for the AP shortening (Figure 3E,F). RT-qPCR analysis revealed an increase of +227% in the *KCNH2* gene coding for I_{Kr} and +220% in the *KCNQ1* gene coding for I_{Ks} in DSC2-hiPSC-CMs compared to control-hiPSC-CMs (Figure S4). Exposure of DSC2-hiPSC-CMs to T007 prevented the differences with control-hiPSC-CMs (Figures 3A–F and S3–S5).

We evaluated the Ca^{2+} transients of spontaneously beating hiPSC-CMs using the fluorescent non-ratiometric Fluo-4 Ca^{2+} -sensitive dye. The DSC2-hiPSC-CMs (vs. control-hiPSC-CMs) exhibited increased Ca^{2+} transient frequency but decreased decay time and global Ca^{2+} mobilised area under the curve (AUC) during the Ca^{2+}

transient (Figure 4A–C) in coherence with impaired contractility. They also exhibited an increase in the number and frequency of pro-arrhythmic abnormal spontaneous diastolic microscopic Ca^{2+} events (Ca^{2+} sparks), reflecting Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum through the ryanodine receptor. Treatment of the DSC2-hiPSC-CMs with T007 attenuated all these effects (Figure 4D,E).

Late T007 incubation (D55–D60) could not reverse the variant-specific modifications of the AP in DSC2-hiPSC-CMs (Figure S5). In addition, when we cultured DSC2-hiPSC-CMs in the presence of T007 between D20 and D60 and then removed the drug at D100, the cells exhibited the typical disease phenotype (Figure S5). Therefore, early and continuous exposure of DSC2-hiPSC-CMs to T007 is required to maintain a wild-type-like cellular electrophysiological signature (Figure S6).

In conclusion, the repressing effect of T007 on PPAR γ transcriptional activity maintained regular electrical activity and Ca^{2+} handling in hiPSC-CMs bearing the *DSC2* (c.394C>T) mutation. T007 also lowered early pro-arrhythmic events intrinsic to cardiomyocytes, likely to contribute to rhythm disturbance independently of fibrofatty replacement of myocardial tissue in ACM

patients (Figure S7). The risk of malignant ventricular tachyarrhythmias relies both on (i) shortened AP repolarisation, responsible for short QT (and JTc) intervals in a cohort of patients,³ caused by high *KCNH2* (I_{Kr}) and *KCNQ1* (I_{Ks}) expressions and (ii) and abnormal occurrence of Ca^{2+} sparks known to promote arrhythmias independently of any change in the AP and QT interval.⁷ Combining a short AP (QT) with disturbed Ca^{2+} is likely to increase the pro-arrhythmogenic risk. Our results align with different studies in transgenic mice linking PPAR γ activation, cardiomyocyte lipid accumulation, dilated cardiomyopathy, changes in electrophysiological profile and intracellular Ca^{2+} handling, and arrhythmogenic risks, although differences between mice and humans may limit some interpretations.^{6,8–10} Overall, our study provides new comprehensive insights directly in human cardiomyocytes regarding the role of PPAR γ in genetic ACM. Repression of PPAR γ transcription may offer a unique opportunity for ACM treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the 'Montpellier Ressources Imagerie' (MRI) platform (<https://www.mri.cnrs.fr/fr/>). A CIFRE grant from Sanofi R&D supported this work to Jean-Baptiste Reisqs. Fond Marion Elisabeth Brancher supported the post-doctoral fellowship of Adrien Moreau.

FUNDING INFORMATION

A CIFRE grant from Sanofi R&D supported this work to Jean-Baptiste Reisqs. Fond Marion Elisabeth Brancher supported the post-doctoral fellowship of Adrien Moreau.

CONFLICT OF INTERESTS

Sanofi, a global biopharmaceutical company focused on human health, employs Jean-Baptiste Reisqs, Veronique Briand and Philippe Beauverger. All other authors have nothing else to disclose. All authors read and approved the final version of the manuscript and ensure it was the case.

Jean-Baptiste Reisqs^{1,2}
 Adrien Moreau³ 
 Azzouz Charrabi³
 Yvonne Sleiman³
 Albano C. Meli³
 Gilles Millat^{1,4,5}
 Veronique Briand²
 Philippe Beauverger²
 Sylvain Richard³ 
 Philippe Chevalier^{1,4}

¹Neuromyogene Institute, Claude Bernard University, Lyon 1, Villeurbanne, France

²Cardiovascular and Metabolism Research, Sanofi R&D, Chilly Mazarin, France

³Université de Montpellier, INSERM, CNRS, PhyMedExp, Montpellier, France

⁴Hospices Civils de Lyon, Lyon, Service de Rythmologie, France

⁵Laboratoire de Cardiogénétique Moléculaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Bron, France

Correspondence

Sylvain Richard, INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier, PhyMedExp, CHU Arnaud de Villeneuve, Bâtiment Crastes de Paulet, 371 Avenue du doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France.

Email: sylvain.richard@inserm.fr

Philippe Chevalier, Service de Rythmologie Cardiaque, CHU de Lyon HCL, GH Est-Hôpital Louis Pradel 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France.

Email: philippe.chevalier@chu-lyon.fr

Jean-Baptiste Reisqs, Adrien Moreau, Sylvain Richard and Philippe Chevalier contributed equally as junior and senior investigators, respectively.

ORCID

Adrien Moreau  <https://orcid.org/0000-0003-3100-0807>

Sylvain Richard  <https://orcid.org/0000-0001-9460-6705>

REFERENCES

- Awad MM, Calkins H, Judge DP. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5:258-267. <https://doi.org/10.1038/ncpcardiol182>
- Ma D, Wei H, Lu J, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2013;34:1122-1133. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs226>
- Moreau A, Reisqs J-B, Delanoe-Ayari H, et al. Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: from ion channels to ECG and tailored drug therapy. *Clin Transl Med*. 2021;11:e319. <https://doi.org/10.1002/ctm2.319>
- Brust R, Shang J, Fuhrmann J, et al. A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPAR γ . *Nat Commun*. 2018;9:4687. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07133-w>
- Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2006;116:2012-2021. <https://doi.org/10.1172/JCI27751>
- Kim C, Wong J, Wen J, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494:105-110. <https://doi.org/10.1038/nature11799>
- Thireau J, Pasquie J-L, Martel E, et al. New drugs vs. old concepts: a fresh look at antiarrhythmics. *Pharmacol Ther*.

- 2011;132:125-145. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.03.003>
8. Son N-H, Park T-S, Yamashita H, et al. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest*. 2007;117:2791-2801. <https://doi.org/10.1172/JCI30335>
9. Morrow JP, Katchman A, Son N-H, et al. Mice with cardiac overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ have impaired repolarization and spontaneous fatal ventricular arrhythmias. *Circulation*. 2011;124:2812-2821. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.056309>
10. Xie Y, Gu Z-J, Wu M-X, et al. Disruption of calcium homeostasis by cardiac-specific over-expression of PPAR- γ in mice: a role in ventricular arrhythmia. *Life Sci*. 2016;167:12-21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.014>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

Étude IV : Étude préliminaire des effets cellulaires de l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone

Nos derniers travaux concernent une étude préliminaire dans la prévention de la progression de la CA. En effet, comme déjà mentionné, dans cette pathologie, les cardiomyocytes sont progressivement remplacés par du tissu fibro-adipeux. Concernant les formes majoritairement décrites jusqu'alors, ceci atteint préférentiellement le ventricule droit, entraînant une détérioration de sa fonction dans un premier temps, puis de la structure du cœur dans sa globalité. Le traitement actuel des patients atteints de CA est empirique et souvent basé sur la prévention des arythmies. Plusieurs voies de signalisation cellulaire ont été décrites comme étant impliquées dans la progression de la pathologie dont la voie Wnt/ β -caténine ou, comme vu dans l'étude précédente, la voie PPAR γ . Cependant, d'autres voies de signalisation cellulaire n'ont pas encore été explorées pour prévenir ou réduire l'infiltration fibro-adipeuse. Une étude a montré, chez des patients souffrant d'une insuffisance cardiaque congestive (ICC), une activation à long terme du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA) (Weber and Brilla 1991). Ceci a pour conséquence un remodelage progressif du cœur, notamment avec l'apparition de fibrose myocardique, médiée par l'activation à long terme du système RAA. Une autre étude a montré que l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine chez des patients présentant une ICC pouvait réduire le risque d'arythmies ventriculaires (Fletcher et al. 1993). Le système RAA est un système hormonal localisé dans le rein avec un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle, notamment par l'action de l'angiotensine II (Sparks et al. 2014). L'angiotensine II est formée à la suite d'une cascade de réactions enzymatiques dans laquelle la rénine clive l'angiotensinogène pour former l'angiotensine I, qui est ensuite clivée par une enzyme de conversion pour former l'angiotensine II (Sayer and Bhat 2014). Au niveau cardiaque, l'angiotensine II stimule les récepteurs AT1 conduisant à une hypertrophie cellulaire (Baker and Aceto 1990). Cependant, l'angiotensine II engendre également une hypertrophie des fibroblastes et un dépôt de collagène, favorisant finalement la fibrose myocardique (Peng et al. 2002).

L'hypothèse du travail réalisé ici était que l'utilisation de médicaments anti-fibrotiques ciblant le système RAA pourrait empêcher ou réduire l'incapacité myocardique dans la CA. Une étude clinique randomisée, utilisant la spironolactone, va débiter chez des patients atteints de CA afin d'étudier l'effet de ce diurétique et inhibiteur du système RAA, sur le remodelage ventriculaire et sur l'apparition d'arythmies. Cette étude clinique va principalement s'intéresser aux effets globaux, et notamment systémiques du système RAA, médiés par la spironolactone

qui est un inhibiteur de ce système. La spironolactone est un diurétique antagoniste de l'aldostérone, inhibiteur donc du système RAA, et qui permet également de retenir le potassium. Cette molécule est métabolisée dans le foie en acide canrénoïque (AC), ou canrenoate, dans l'organisme (Karim and Brown 1972; H. Chen et al. 2006). L'AC correspond au métabolite actif majeur provenant de la spironolactone (Gardiner et al. 1989). C'est pourquoi nous avons comme objectif de tester l'acide canrénoïque en priorité dans notre modèle d'hiPSC-CM afin d'étudier les effets sur les propriétés électrophysiologiques.

Le but de ce travail était de tester la spironolactone et l'acide canrénoïque (AC) sur les hiPSC-CM mutés DSC2 afin d'évaluer l'effet bénéfique potentiel du traitement au niveau cellulaire et son transfert aux patients. Les propriétés contractiles et électrophysiologiques des hiPSC-CM mutés pour la DSC2 ont été étudiées après une incubation avec la spironolactone à 20 μ M ou l'acide canrénoïque à 10 nM pendant 1 heure.

La fonction contractile des hiPSC-CM a été étudiée de la même manière que lors des précédentes études, par enregistrements de vidéos. Les résultats sont présentés dans la figure 24. Tout d'abord, nous retrouvons bien une fonction contractile perturbée, avec un taux d'asynchronie significativement augmenté chez les hiPSC-CM mutées DSC2 par rapport aux hiPSC-CM contrôles (Figure 24). Après une heure d'incubation avec l'AC, nous avons pu observer tout d'abord une normalisation de la fréquence des contractions spontanées (A). Cependant, les différents paramètres de la contraction, à savoir la vitesse d'ascension de la contraction (B), ainsi que la durée de contraction, avec ou sans correction par la formule de bazett, ne sont pas modifiés après l'application de l'AC (C-D). Cependant, l'aire sous la courbe (représentant l'ensemble des paramètres contractiles) tend à être normalisée avec l'AC, malgré une différence significative entre les conditions contrôles et mutées incubées avec l'AC (E). Enfin, le taux d'asynchronie n'est pas modifié avec l'incubation de l'AC. La fréquence des contractions spontanées ainsi que l'aire sous la courbe, nous indiquent que l'AC a un effet bénéfique sur la fonction contractile des hiPSC-CM, malgré une absence d'amélioration d'autres paramètres. A ce stade, nous avons considéré qu'une étude électrophysiologique nous permettrait de mieux discerner les effets cellulaires de l'AC.

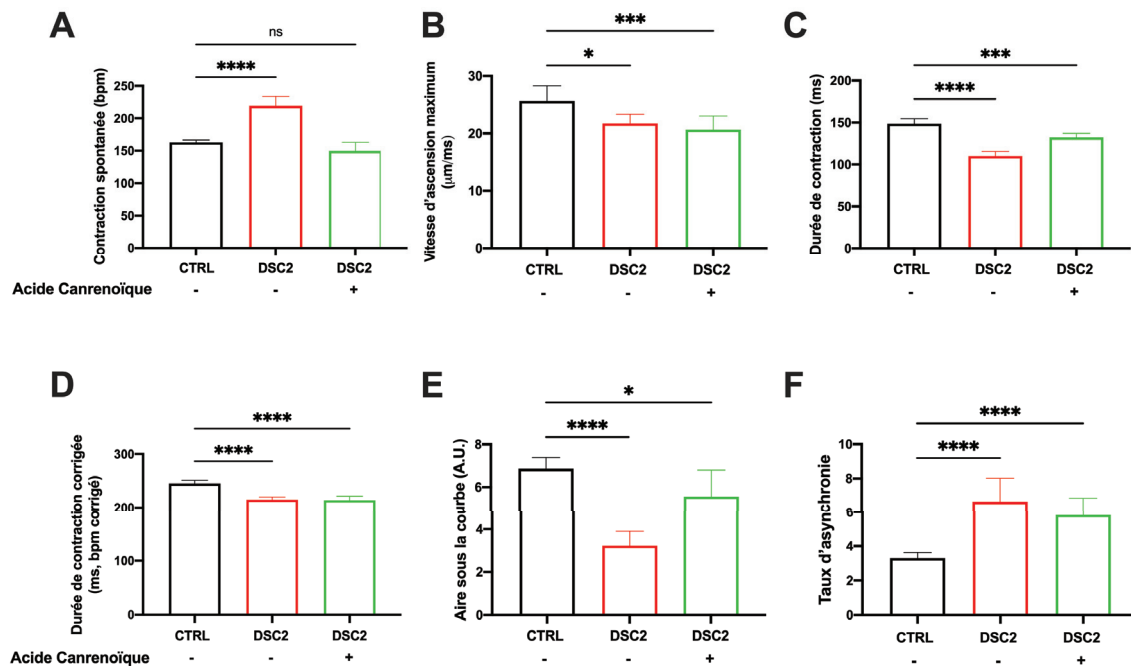


Figure 24 : Effet de l'Acide canrénoïque sur les propriétés contractiles des hiPSC-CM

L'activité contractile a été étudiée par analyse vidéo à partir d'une monocouche cellulaire en condition contrôle (noir, n=386), patient (rouge, n=275) et incubé avec l'AC (vert, n=166) : beat rate (A), Maximum contraction slope (B), Contraction duration (C) et corrigé avec Bazett (D), Area under the curve (E) et Asynchronous rate (F). Les résultats sont représentés avec la médiane et 95% d'intervalle de confiance. * différence par rapport au contrôle. *** P<0,001 (Kruskal-Wallis test)

L'enregistrement de l'activité électrique cellulaire, réalisé par acquisition des PA, a été réalisé après l'incubation avec, soit de l'AC, soit de la spironolactone directement. Les résultats sont présentés dans les figures 25 et 26.

Premièrement, comme il est possible d'observer dans la figure 25A, l'AC a allongé la durée du PA des hiPSC-CM mutées DSC2, d'un point de vue qualitatif. Cette molécule a permis également de rétablir la dynamicité de la durée du PA en fonction de la fréquence (B). Enfin, la mesure de l'APD₉₀ et de l'APD₅₀, montre, d'un point de vue quantitatif, une normalisation de la durée du PA avec l'AC (C-D). La mesure de l'APD₉₀ démontre une légère augmentation, non significative, avec l'AC (386±98 ms CTRL vs. 401±99 ms DSC2+AC, standard déviation). Cependant, la mesure de l'APD₅₀ marque une légère diminution de cette valeur à savoir une médiane de 269±83 ms dans les hiPSC-CM contrôles et 246±95 ms dans les hiPSC-CM DSC2 incubées avec l'AC. Cette observation pourrait indiquer un effet plus important de l'AC sur les courants potassiques. Les mêmes résultats ont été observés avec l'application de la spironolactone à 20 µM pendant 1 heure. En résumé, la spironolactone a normalisé la durée du PA, avec également un retour à la normale d'une dynamicité électrique en fonction de la

fréquence (figure 26A et B). D'un point de vue quantitatif, comme pour l'AC, nous observons une légère augmentation de l'APD₉₀ (386±98 ms CTRL vs. 423±152 ms DSC2+spironolactone), alors que l'APD₅₀ marque une légère diminution (269±83 ms CTRL vs. 217±105 ms DSC2+spironolactone), non significative, entre les cellules contrôles et mutées DSC2 incubées avec 20 µM de spironolactone (figure 26C et D). Ceci conforte notre hypothèse d'une inhibition des courants potassiques par l'AC et la spironolactone.

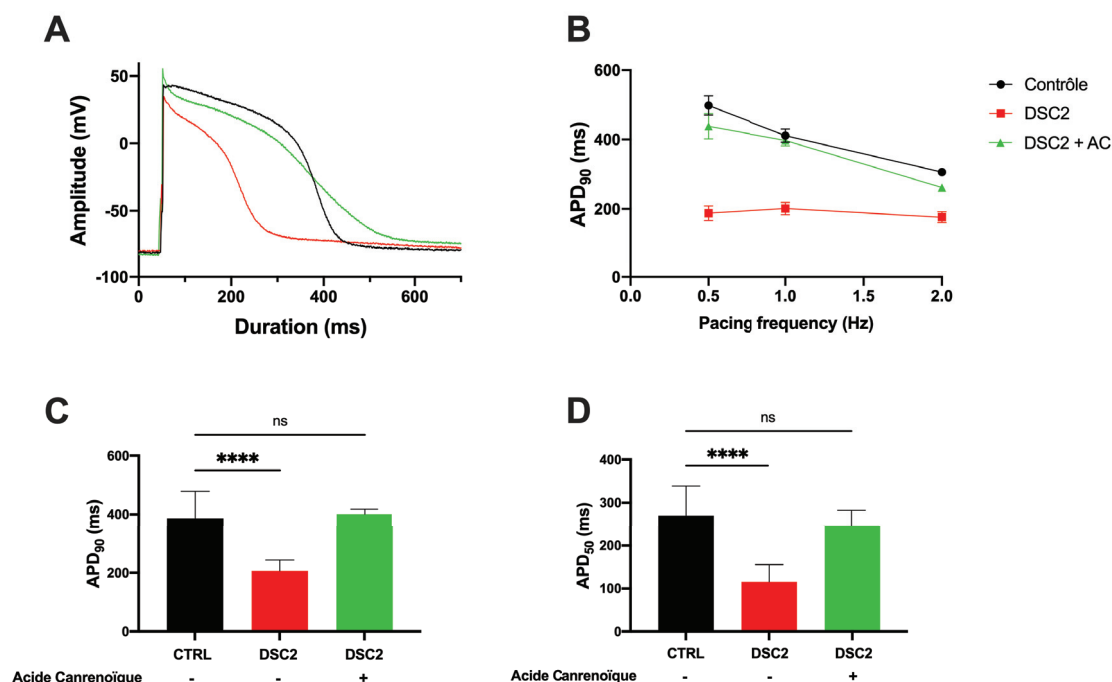


Figure 25 : Effet de l'Acide canrénoïque sur le Potentiel d'action des hiPSC-CM

(A) Traces brutes d'un potentiel en condition contrôle (noir, n=27), muté DSC2 (rouge, n=32) et après incubation de l'AC (vert, n=43). (B) Adaptation de la durée du PA à 90% de repolarisation en fonction de la fréquence de stimulation (0,5, 1 et 2 Hz). Valeurs de la durée du potentiel d'action à 90% de repolarisation (C) et 50% de repolarisation (D). Les résultats sont représentés avec la médiane et 95% d'intervalle de confiance. * différence par rapport au contrôle. *** P<0,001 (Kruskal-Wallis test)

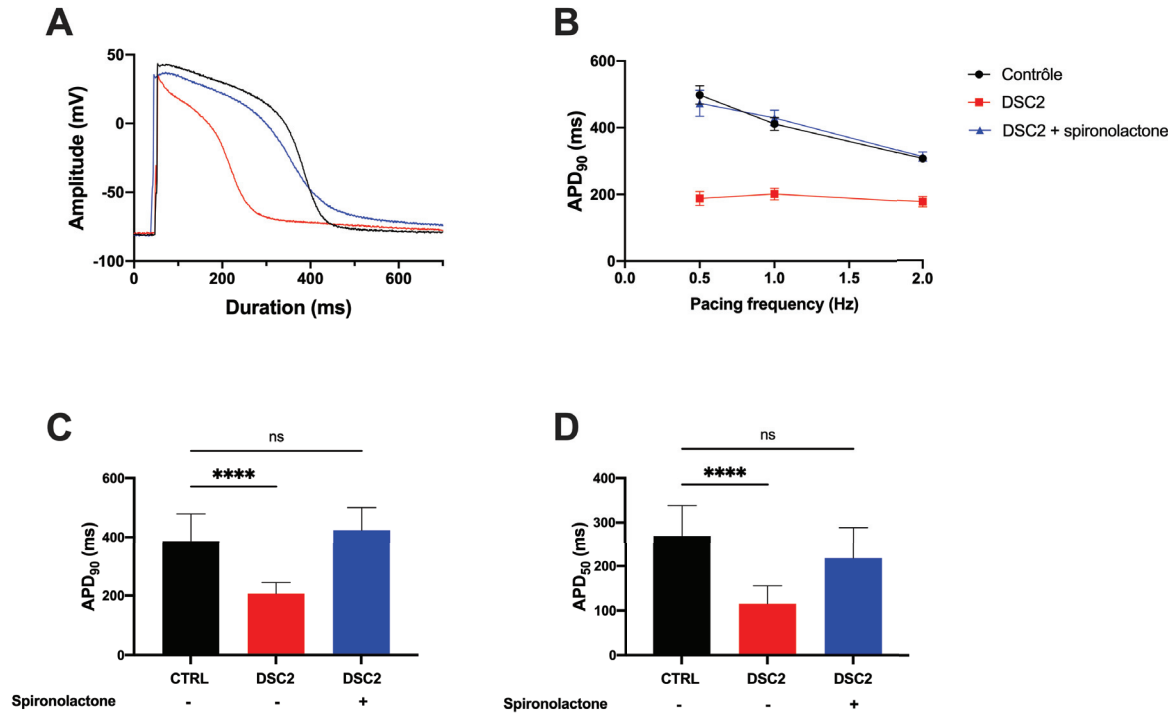


Figure 26 : Effet de la spironolactone sur le Potentiel d'action des hiPSC-CM

(A) Traces brutes d'un potentiel en condition contrôle (noir, n=27), muté DSC2 (rouge, n=31) et après incubation de la spironolactone (vert, n=41). (B) Adaptation de la durée du PA à 90% de repolarisation en fonction de la fréquence de stimulation (0,5, 1 et 2 Hz). Valeurs de la durée du potentiel d'action à 90% de repolarisation (C) et 50% de repolarisation (D). Les résultats sont représentés avec la médiane et 95% d'intervalle de confiance. * différence par rapport au contrôle. *** P<0,001 (Kruskal-Wallis test)

Nous avons, dans un dernier temps, enregistré les courants potassiques globaux des hiPSC-CM, par la technique de patch-clamp, afin d'évaluer l'effet de l'AC sur ces courants ioniques. Les résultats sont représentés dans la figure 27. Premièrement, sur la courbe courant/potentiel, il est possible d'observer un courant potassique plus important dans les hiPSC-CM DSC2 par rapport aux hiPSC-CM contrôles, comme constaté lors des études précédentes. L'ajout de l'AC chez les hiPSC-CM DSC2 induit une diminution de la densité des courants potassiques (A). Ces courants sont similaires aux contrôles entre -40 mV et 0 mV. Entre 0 et +40 mV, la densité de courant potassique des cellules diminue par rapport aux contrôles (A). Les mesures de densité de courant à +40 mV, confirment cette observation (B). En effet, les hiPSC-CM arborent une densité de courant de 2,3 pA/pF alors que les hiPSC-CM DSC2 ont une densité de courants de 1,2 pA/pF avec l'AC (B). Ces résultats sont en accord avec l'enregistrement des PA qui met en évidence une augmentation de l'APD₉₀ par l'AC et la spironolactone.

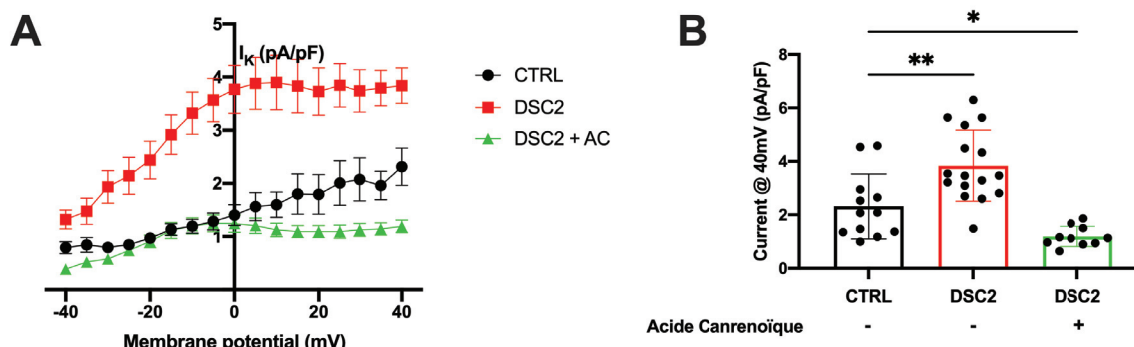


Figure 27 : Effet de l'Acide canrénoïque sur les canaux potassiques

(A) Courbes courants potentiels entre les conditions contrôles (noir, n=12), mutés DSC2 (rouge, n=16) et incubé avec l'AC (vert, n=10). (B) Amplitude du courant à 40 mV. Les résultats sont représentés avec la moyenne et la SEM. * différence par rapport au contrôle. *** P<0,001 (Kruskal-Wallis test)

La spironolactone (et plus particulièrement son métabolite actif majeur : l'AC), pourrait, chez les patients avec une CA devenir une option thérapeutique bénéfique. En effet, l'activation prolongée du système RAA accentue le remplacement fibreux au niveau cardiaque (Crawford, Chobanian, and Brecher 1994). Le remplacement fibro-adipeux étant l'une des caractéristiques de la CA, l'inhibition de ce système semble donc intéressante pour prévenir le remodelage morphologique. Une étude clinique randomisée est en cours pour répondre à cette hypothèse (Morel et al. 2018). Cependant, les effets directs de la spironolactone, l'inhibiteur du système RAA, ont très peu été explorés au niveau des cardiomyocytes.

Dans l'organisme, la spironolactone est métabolisée en plusieurs métabolites, dont l'AC qui correspond au métabolite majeur. C'est dans ce contexte que nous avons testé l'effet de l'incubation d'une heure de l'AC sur les hiPSC-CM présentant une mutation sur le gène de la DSC2.

L'étude fonctionnelle des hiPSC-CM montre une amélioration de la fréquence des contractions spontanées, ainsi des paramètres globaux de contraction, représentés par l'aire sous la courbe, après l'application de l'AC. Cependant, la durée et la vitesse de contraction, ainsi que le taux d'asynchronie n'est pas amélioré par l'AC. La vitesse de contraction étant régie par l'entrée de sodium et la durée de contraction par le calcium entrant dans la cellule, la normalisation des paramètres globaux de la contraction semble indiquer que l'AC agit sur les courants potassiques. L'étude électrophysiologique, par enregistrement des PA, va dans ce sens. En effet, la normalisation de la durée du PA est en lien avec une fréquence spontanée et une contraction cardiaque normalisée par l'AC. Le retour à la normale des courants potassiques globaux explique cette normalisation du PA. De plus, la normalisation de la repolarisation diminue la

dispersion de cette repolarisation et minimise ainsi le substrat arythmogène. Cette observation démontre un avantage significatif de l'utilisation de l'AC. L'APD à 90% de repolarisation est augmenté de 4%, alors que l'APD à 50% de repolarisation diminue de 20%, par rapport aux conditions contrôles, après l'application de l'AC. Ces résultats suggèrent une action inhibitrice de l'AC plutôt centrée sur les canaux Kv7.1 régissant le courant potassique I_{Ks} .

Ces résultats préliminaires, au niveau cellulaire, supportent une amélioration des propriétés électriques et mécaniques et pourraient soutenir l'utilisation d'une nouvelle voie thérapeutique chez le patient. Cependant, une exploration plus approfondie de l'action de l'AC est nécessaire. En effet, l'action systémique du système RAA n'est pas possible à évaluer au niveau des hiPSC-CM, par définition, et donc nécessite un système physiologique intégré. L'avantage principal de l'AC vu dans cette étude est que cette molécule empêche le maintien des arythmies en diminuant la dispersion de repolarisation, car ceci crée un substrat arythmogène en condition pathologique. Cependant, son effet sur le calcium, et notamment sur les *sparks* calciques, n'a pas été documenté. Ceci serait très intéressant à étudier, par la suite, car ces événements calciques aberrants participent très souvent et très largement à la création d'une instabilité cellulaire qui est un facteur déclencheur proarythmogénique.

E. Discussion

La CA est une maladie rare caractérisée par un remplacement fibro-adipeux du myocarde. Cette pathologie est habituellement diagnostiquée à l'adolescence ou chez l'adulte jeune. Ce diagnostic est souvent lié à l'apparition de plusieurs syncopes chez le patient. Le remodelage cardiaque conduit à une instabilité de l'activité électrique, ce qui favorise le phénomène de réentrée et donc l'apparition de tachycardie ventriculaire ou bien d'arythmies ventriculaires. La CA peut conduire à une insuffisance cardiaque irréversible chez le patient. Des études moléculaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'apparition et le développement de cette maladie afin d'espérer un traitement efficace qui jusqu'à présent fait défaut.

Lorsque j'ai commencé mes travaux de thèse, différents modèles d'étude existaient déjà pour mieux comprendre la pathologie. Tout d'abord, la lignée cellulaire HL-1 a été le premier modèle cellulaire pour imiter les cardiomyocytes dans la CA. C'est à partir de cette lignée cellulaire que les perturbations de plusieurs voies de signalisations, telles que la voie Wnt, Hippo ont été découvertes (Garcia-Gras et al. 2006; S. N. Chen et al. 2014). Cependant, ce modèle présente plusieurs lacunes. Premièrement, ses origines murines constituent une limite pour la modélisation des maladies humaines. Deuxièmement, les cellules HL-1 ont une origine atriale et présentent une organisation de l'ultrastructure typique des cellules du muscle cardiaque auriculaire embryonnaire, avec des réseaux parallèles de myofibrilles mal organisés; ainsi, ces cellules ne récapitulent pas complètement les cardiomyocytes ventriculaires (Elena Sommariva et al. 2017). Une seconde stratégie était d'utiliser des cardiomyocytes, non pas issus d'une lignée cellulaire, mais de modèle animal. Des cardiomyocytes de rat et d'un modèle de poisson zèbre ont été utilisés notamment pour étudier les propriétés électrophysiologiques (Cerrone et al. 2012; Gomes et al. 2012; Asimaki et al. 2014). Les cardiomyocytes d'origine animale représentent une source précieuse et accessible de cellules fonctionnelles. Mais ils souffrent de la limitation de leur origine non humaine. Par conséquent, les observations obtenues avec ces modèles doivent être confirmées dans des modèles dérivés de l'Homme. C'est pour ces raisons que la CA est maintenant étudiée à l'aide des hiPSC-CM. Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse se sont inscrits dans cette dynamique.

I. Les hiPSC-CM comme modèle d'étude de la cardiomyopathie arythmogène ?

Dans nos études, nous avons utilisé les hiPSC-CM comme modèle *in-vitro* offrant un accès unique pour étudier les fonctions cellulaires cardiaques et les voies de signalisation non accessibles chez un patient atteint de la CA.

Notre première étude concerne l'étude de l'ultrastructure de notre modèle de CA à partir d'hiPSC-CM. La MET récapitule les changements morphologiques vus dans des études précédentes (Garcia-Gras et al. 2006; Caspi et al. 2013; d'Amati et al. 2000). Pour résumer, les hiPSC-CM portant la mutation R132C de la DSC2 semblent présenter une diminution de la densité protéique au niveau des desmosomes. Ceci confirme la pathogénicité de la mutation sur l'ancrage et le maintien des desmosomes entre eux. En effet, une mutation sur un gène desmosomal entraîne une déstabilisation du desmosome à la membrane et perturbe la connexion entre deux cardiomyocytes (Z. Yang et al. 2006). Cependant, ce dernier aspect n'a pas pu être observé par MET, en raison de notre méthode de culture qui oblige les cellules à rester ancrer à une matrice. En revanche, la méthode de culture par EB permettrait d'observer un possible détachement des cardiomyocytes entre eux, induit par la mutation sur la DSC2. De plus, les cardiomyocytes arborent un appareil contractile altéré avec une accumulation lipidique lors de l'observation en MET. La présence de ces deux composantes, au sein d'une même cellule, confirme l'origine cardiomyocytaire et donc une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocyte. Le remplacement fibro-adipeux, ainsi que l'accumulation lipidique des cardiomyocytes, crée au niveau cardiaque des blocs de conduction propices à générer des arythmies de réentrées (Ten Tusscher and Panfilov 2007). Cependant, le déclenchement des arythmies, dans le cadre de la CA, peut aussi avoir une origine myocytaire en raison d'un remodelage électrophysiologique.

Lors de notre deuxième étude, l'utilisation des hiPSC-CM dérivés d'un patient muté pour la DSC2 a démontré que les arythmies constituent un mécanisme pathologique direct et ne sont pas la conséquence du remodelage tissulaire intervenant au cours de la progression de la pathologie. En effet, le remplacement fibro-adipeux, qui est une caractéristique majeure de la CA, a longtemps été considéré comme le principal mécanisme pro-arythmogène dans cette pathologie. Peu d'études se sont concentrées sur les caractéristiques électriques profondes des cardiomyocytes. Cette première étude a révélé que le PA des hiPSC-CM mutés DSC2 est plus

court sous les effets combinés d'une densité accrue de courant potassique et d'une densité réduite de courants calciques voltage-dépendants. L'augmentation des courants potassiques est en accord avec une autre étude utilisant des hiPSC-CM dérivés d'un patient muté pour la DSG2 (El-Battrawy et al. 2018). Cependant, on notera que la durée du PA n'est pas modifiée dans leur étude. La durée de maturation pourrait expliquer la différence entre les deux études. L'analyse de l'activité contractile à partir de la monocouche des hiPSC-CM a montré un dysfonctionnement de la contraction, cela étant étroitement lié à un taux de battements spontanés et une asynchronie plus importante dans les cellules DSC2. Ceci est en lien avec un taux plus élevé de PA spontanés et des perturbations de l'activité calcique intracellulaire. En effet, une augmentation de l'excitabilité cellulaire peut être expliquée par une perturbation du calcium dans les hiPSC-CM DSC2. Nos études ont notamment révélé des événements calciques microscopiques spontanés et aberrants lors de la phase diastolique des cardiomyocytes. Ces événements aberrants sont communément appelés des *sparks* calciques et participent à l'arythmogénèse de la CA. Ces phénomènes calciques aberrants proviennent d'une fuite du RS par le RYR, mimant ce qui se passe dans la CPVT (Baltogiannis et al. 2019). Ce phénomène est propice au déclenchement de DAD et donc augmente l'excitabilité cellulaire. Les *sparks* calciques observés dans le cadre de la CA sont des éléments déclencheurs des arythmies ventriculaires constatés chez le patient. La littérature confirme cette interprétation. En effet, Cerrone et collaborateurs ont démontré dans un modèle murin déficient pour la PKP2 des dynamiques calciques perturbées (Cerrone et al. 2017). La libération accrue du calcium médiée par le RS a entraîné des arythmies dans leur modèle. Nous avons également observé une densité en courant sodique réduite dans notre lignée d'hiPSC-CM DSC2, en accord avec la littérature rapportant que les desmosomes sont un point d'ancrage pour le canal Nav1.5 au niveau de la membrane plasmique (Sato et al. 2009; Wen et al. 2015; Cerrone et al. 2012).

Dans notre modèle de CA, les défauts mécaniques des cellules portant la mutation DSC2 sont dus à un remodelage cellulaire, mais également électrophysiologique et calcique des cardiomyocytes. Une récente étude a rapporté que deux patients diagnostiqués avec de la CA présentaient des fibrillations ventriculaires avec un cœur morphologiquement normal (Blom et al. 2019). Ceci suggère que les événements arythmiques précèdent les changements structuraux du cœur et conforte une origine myogénique dans le développement des arythmies ventriculaires à un stade précoce chez les patients atteints de la CA. La durée raccourcie du PA que nous avons observée est en lien avec un défaut de l'intervalle QT chez les patients et explique ainsi un syndrome du QT court (Philippe Chevalier et al. 2021). Chez la plupart des

patients, un bloc pariétal ventriculaire droite, une amplitude du QRS réduite et une inversion de l'onde T sont observés, mais la dynamicité de l'intervalle QT n'a jamais été recherchée. Ces observations indiquent que la CA est une pathologie impliquant un trouble de la repolarisation. Ce trouble induit une dispersion de la repolarisation en raison d'une hétérogénéité de cette repolarisation dans le ventricule. Les cellules ne subissant pas toutes le même remodelage électrophysiologique, certaines cellules seraient dans une phase de repos, alors qu'une autre partie de ces cellules n'auraient pas fini leur repolarisation. Ce phénomène crée un bloc de conduction favorisant les arythmies de réentrées, et par conséquent un substrat arythmogène. L'intervalle QT (et plus encore, l'intervalle JT) pourrait alors devenir un indicateur fort permettant d'orienter le diagnostic précoce de patients atteints de la CA. Il a pu être négligé en raison de l'élargissement du QRS : dans un contexte de « QT normal », le cas de complexes QRS élargis sous-entend nécessairement des troubles de la repolarisation (car l'allongement du QRS devrait être retrouvé sur le QT). De plus, la CA étant une maladie évolutive, des temps de repolarisation myocardique courts ne sont peut-être évidents que pendant une courte période. Les traitements médicamenteux peuvent également masquer un défaut de l'intervalle QT. Néanmoins, il serait intéressant d'étudier l'effet de la normalisation du QT chez les patients présentant un JT court. En effet, cette normalisation pourrait ralentir la progression de la CA.

Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés au remodelage morphologique cellulaire et plus particulièrement à la transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes. Les hiPSC-CM étant en culture dans une boîte de pétri, l'implication des autres cellules, telles que les c-kit, les SMC ou les FAP, dans le remplacement fibro-adipeux est impossible à évaluer. Cette approche présente pourtant un avantage essentiel pour étudier des mécanismes purement myocytaires. Ceci limite les interprétations au niveau du cardiomyocyte et non dans un contexte de cohérence tissulaire intégrant différents types cellulaires. Plusieurs études font mention de la voie PPAR γ dans le processus de transdifférenciation (Garcia-Gras et al. 2006; Kim et al. 2013; Wen et al. 2015; D. Ma et al. 2013). Ces études au niveau cellulaire relatent une diminution de l'activité de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et une surexpression du gène PPAR γ . La surexpression de ce gène induit une adipogenèse et une lipogenèse dans ces modèles cellulaires de cardiomyocytes, faisant de ce gène un élément clé dans l'hypothèse d'une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes. Une étude, sur des cœurs de patients atteints de CA, démontre une surexpression de PPAR γ en lien avec un phénotype adipeux dans le ventricule droit (Djouadi et al. 2009). L'expression anormale du gène PPAR γ est donc retrouvée au niveau cellulaire, mais également directement dans le cœur du patient. Dans notre

troisième étude, nous avons également déterminé une surexpression de la voie de signalisation PPAR γ dans le cœur du patient muté DSC2, mais également dans notre modèle d'hiPSC-CM. L'expression du gène cardiaque spécifique (MLC2v) a confirmé le phénotype des cardiomyocytes DSC2 hiPSC-CM. Cependant, la mutation a provoqué une diminution de son expression, alors que l'expression des deux gènes pro-adipogéniques, la périlipine et l'adiponectine ont augmenté. Ces résultats confirment un changement d'identité cellulaire et donc morphologique des cardiomyocytes. L'analyse de l'ultrastructure, par la MET corrobore cette hypothèse. Les cellules subissent une accumulation lipidique et présentent un appareil contractile beaucoup plus immature que chez le contrôle. Ceci témoigne d'une modification structurelle des hiPSC-CM dont PPAR γ est l'une des causes.

Nos études démontrent la capacité de la technologie « hiPSC » à modéliser la CA. L'étude morphologique et fonctionnelle a permis de mettre en lumière les principales caractéristiques phénotypiques connues de la CA, validant donc son utilité. Notre modèle présente ainsi un couplage excitation-contraction altéré et également un changement morphologique avec l'accumulation lipidique. Dans un second temps, il est alors possible de bénéficier du modèle mis au point afin de développer et d'évaluer de nouvelles stratégies dans la prévention et/ou le traitement des patients.

II. Les hiPSC-CM comme outil d'amélioration de traitements préventifs et curatifs des patients ?

Un objectif important dans l'utilisation des hiPSC est d'obtenir des informations essentielles pour modéliser des pathologies humaines, en particulier celles d'origine génétique. La rareté des cas et la complexité de ces pathologies limitent, par définition, les informations accessibles pour comprendre leur évolution, améliorer la prévention et/ou le traitement des patients. Les modèles hiPSC ouvrent des perspectives immenses pour progresser vers des stratégies de médecine personnalisée très adaptées pour le diagnostic (fonctionnel et mécanistique au niveau cellulaire) et la prise en charge de patients atteints de pathologies liées à des mutations. Dans le cadre de la CA, un objectif est de réduire le risque d'arythmie chez le patient. Des médicaments anti-arythmiques sont donc utilisés pour réduire ce risque (Ermakov and Scheinman 2015). Cependant, les études sur la prescription des molécules anti-arythmiques font défaut et leur prescription reste empirique, notamment dans un contexte de pathologie d'origine génétique qui limite à la fois le nombre et la puissance des études cliniques. Dans

notre première étude, nous avons vu que le déclenchement des arythmies était lié à un remodelage électrophysiologique profond du cardiomyocyte et pas seulement à un remodelage morphologique et structural du cœur (apparition de tissu fibro-adipeux). Parmi les molécules testées dans cette étude, le sotalol et la flécainide étaient clairement plus efficaces que les autres molécules testées, telles que le propranolol et le vérapamil, pour normaliser les propriétés électrophysiologiques des hiPSC-CM. Le sotalol est souvent documenté dans la littérature mais ses effets exacts, notamment au niveau cellulaire, sont rarement décrits et interprétés (Ermakov and Scheinman 2015; Wichter et al. 1992; Marcus et al. 2009). L'utilisation du sotalol est limitée en clinique en raison de son inhibition du courant potassique retardé (I_{Kr}) qui allonge l'intervalle QT et peut favoriser l'éclosion de torsades de pointes (Numaguchi et al. 2000; Shugg et al. 2020). Cependant, chez les patients souffrant de la CA, la durée de l'intervalle QT, en lien avec la durée du PA ventriculaire, est court. De ce fait, l'utilisation du sotalol ne fait que normaliser la durée du QT, réduisant ainsi fortement le risque d'arythmie. De plus, le sotalol a permis de réduire l'excitabilité cellulaire spontanée. En effet, nous avons vu que dans notre modèle DSC2, les cardiomyocytes avaient une excitabilité spontanée accrue qui a pu être normalisée par le sotalol. Le sotalol étant aussi un bêta-bloquant, ceci suggère que l'excitabilité cellulaire anormale intègre également très probablement une suractivité β -adrénergique dans le modèle spécifique au patient (Neuvonen and Elonen 2019). Cependant, cette suractivité n'est pas le principal responsable des événements contractiles aberrants dans le modèle hiPSC-CM DSC2. En effet, le sotalol est associé à une autre molécule anti-arythmique : la flécainide. La flécainide a été proposée comme traitement pour prévenir les ondes calciques diastoliques et les arythmies dans la CPVT (Lieve, Wilde, and van der Werf 2016). L'utilisation de la flécainide peut être remise en cause dans son utilisation chez des patients atteints de la CA, à cause de son inhibition sur les courants sodiques qui sont déjà diminués. Cependant, la flécainide agit aussi de manière directe sur le RYR, ce qui permettrait de réduire les événements calciques aberrants et pro-arythmogènes (Mehra et al. 2014). Dans notre modèle cellulaire, l'utilisation de la flécainide a permis de normaliser les dynamiques calciques et de réduire le nombre de *sparks* calciques. Les *sparks* calciques étant aussi responsables d'une excitabilité cellulaire anormale, ces résultats confortent l'utilisation de cette molécule anti-arythmique, en accord avec une étude précédente utilisant la flécainide dans un modèle murin déficient pour la PKP2 (Cerrone et al. 2017). La prescription de la flécainide doit tout de même rester prudente, en raison de son effet sur la réduction des courants sodiques. En cas de CA, le sotalol permet de normaliser la durée du QT et de s'opposer à une suractivité β -adrénergique éventuelle. La

flécainide, quant à elle, réduit le risque d'arythmies en normalisant les dynamiques calciques. Ces résultats soutiennent l'utilisation de ces médicaments chez les patients atteints de la CA.

L'utilisation de ces molécules réduit le risque d'arythmies chez les patients. Cependant le problème de fond n'est pas résolu ou encore mal compris. Nous avons voulu dans un deuxième temps prévenir les changements électrophysiologiques des hiPSC-CM DSC2. L'une des voies clés dans ces changements est la voie PPAR γ que nous avons inhibée précocement et sur le long terme. Pour rappel, les hiPSC-CM mutés DSC2 présentent une expression génique accrue de PPAR γ et de deux gènes cibles (la périlipine et l'adiponectine). L'inhibition précoce et à long terme de PPAR γ , par le T007, a prévenu les changements délétères dans l'expression des gènes au fil du temps dans les DSC2 hiPSC-CM, validant ainsi notre modèle d'investigation fonctionnelle de l'effet du T007 sur le phénotype cellulaire des hiPSC-CM mutés DSC2. Dans la CA, la voie de signalisation PPAR γ affecte le changement morphologique des cardiomyocytes, mais son rôle dans le déclenchement des arythmies est inconnu (Caspi et al. 2013; D. Ma et al. 2013). Un résultat clé de notre étude est que le T007 a empêché plusieurs défauts dans les paramètres du couplage excitation-contraction dus à la mutation DSC2. En effet, une exposition prolongée avec le T007 pendant 40 jours a normalisé les défauts électriques, comme la durée du PA, les courants sodiques et potassiques. Le T007 a également empêché les aberrations contractiles. Deux éléments sont pro-arythmogènes : la durée du PA et les *sparks* calciques. L'incubation à long terme a permis de prévenir les défauts de l'homéostasie calcique et de réduire la fréquence d'apparition des *sparks*. Une incubation tardive avec le T007 pendant cinq jours, c'est-à-dire entre 55 et 60 jours en culture, est insuffisante pour inverser les modifications spécifiques de la mutation DSC2 dans les hiPSC-CM, soutenant l'idée d'un processus évolutif lent et sans doute irréversible, résultant d'une suractivation de la voie PPAR γ . De plus, une exposition continue à long terme à T007 est nécessaire pour maintenir une signature électrophysiologique cellulaire proche du contrôle. En effet, lorsqu'on enlève la molécule entre J60 et J100, les cellules mutées DSC2 retrouvent un phénotype pathologique, suggérant qu'une inhibition continue de la voie PPAR γ est nécessaire pour prévenir le remodelage électrophysiologique. De plus, l'agoniste PPAR γ (GW1929) n'a pas réussi à induire les altérations cellulaires associées au variant DSC2 (c.394C>T). Ce résultat est conforme à une étude montrant que l'expression de PPAR γ est insuffisante pour induire l'adipogenèse dans le muscle squelettique (Ban et al. 2008). Dans l'ensemble, nos résultats démontrent une implication de la voie PPAR γ dans le remodelage électrophysiologique des cardiomyocytes et révèlent que son inhibition est suffisante pour prévenir ces modifications.

Notre étude a aussi permis de mettre en lumière que les défauts dans le couplage excitation-contraction sont présents précocement dans les hiPSC-CM mutés DSC2.

Une autre stratégie était de prévenir le remodelage morphologique en ciblant le système RAA. En effet, dans le cadre de l'insuffisance cardiaque congestive, le système RAA participe à l'infiltration fibro-adipeuse dans le ventricule (Fletcher et al. 1993; Weber 1999). A partir de ces études, le but était d'étudier les effets d'un inhibiteur du système RAA, la spironolactone, sur les propriétés électriques des hiPSC-CM. La spironolactone est métabolisée dans le foie en plusieurs métabolites parmi lesquels l'AC représente la majorité (environ 80%) (Karim 1978). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur l'incubation de l'AC dans cette quatrième étude. D'un point de vue global, l'AC a normalisé différents paramètres dont la durée du PA, par son action sur les courants potassiques. Cette étude permet de démontrer un effet aigu de l'AC sur les canaux potassiques. Il semblerait que son action agit préférentiellement sur les canaux régissant le courant I_{Ks} . En effet, l'APD₉₀ est normalisé par rapport aux contrôles, alors que l'APD₅₀ reste diminué de 20% après l'application de l'AC. En outre, l'application de la spironolactone permet de réduire les troubles de la repolarisation conduisant à une induire une boucle de réentrée, comme décrite précédemment. En revanche, l'AC n'a pas permis de réduire le taux d'asynchronie de la monocouche d'hiPSC-CM, ce qui indiquerait que l'incubation seule de l'AC ne permet pas de prévenir totalement l'apparition des arythmies au niveau cellulaire et devraient en conséquence être appliqué avec une autre molécule anti-arythmique. Bien que ce travail nécessite d'être complété avec des données supplémentaires, que ce soit en clinique ou en recherche fondamentale, l'inhibition du système RAA est très probablement une cible thérapeutique prometteuse.

III. Limites et Perspectives

La technologie des hiPSC-CM est une approche qui permet de travailler sur des modèles de cellules cardiaques humaines. La plupart des canaux ioniques cardiaques sont retrouvés dans les hiPSC-CM, ce qui représente une force pour la caractérisation électrophysiologique (Honda et al. 2011; Zhao et al. 2018). Cependant, ces cellules ont des limites spécifiques malgré leurs nombreux avantages, comme une structure contractile immature (Lundy et al. 2013) et une contraction spontanée des hiPSC-CM (Karakikes et al. 2015) ; ce que nous confirmons dans notre étude ultra-structurale réalisée en microscopie électronique et nos études fonctionnelles.

Il est cependant essentiel de noter que nos travaux sont basés uniquement sur un seul patient et donc une seule mutation. Cela constitue donc à la fois une force caractérisée par l'approche « personnalisée » dans un contexte de démarche à visée clinique, mais aussi une faiblesse car il est sans doute difficile de généraliser les mécanismes découverts aux effets d'autres mutations. En conséquence, ces données ont été validées en clinique, par le biais de l'étude rétrospective d'une petite cohorte de patients (partie II – résultats) présentant différents variants génétiques. L'étude de cette cohorte démontre une dynamique du QT qui est altérée chez une partie des patients (Chevalier et al. 2021), indiquant un processus général pas seulement focalisé sur le défaut du gène DSC2. Par ailleurs, il serait intéressant, de confirmer nos résultats par l'étude d'autres mutations telle que PKP2 qui demeure l'une des mutations les plus fréquentes (M. Zhang et al. 2012). Cette confirmation pourrait notamment concerner l'approche de l'inhibition de la voie PPAR γ , afin de valider sa pertinence thérapeutique.

Nous avons également choisi de renforcer nos résultats par le biais de l'étude de multiples modèles. Ainsi, la combinaison de données cliniques, de données *in-vivo* issues du poisson zèbre et des données cellulaires obtenues sur les hiPSC-CM a permis de révéler des perturbations contractiles majeures avec une durée de PA plus courte soutenant une repolarisation cellulaire anormale. L'excitabilité cellulaire accrue et la présence d'évènements arythmiques sont soutenues par une dynamique calcique perturbée et l'apparition de *sparks* calciques. Des études fonctionnelles plus poussées sur le RYR pourraient être intéressantes, afin de comprendre si ce canal est perturbé à la suite d'une mutation sur un gène desmosomal.

Mes études ont permis de montrer une transdifférenciation des hiPSC-CM en adipocytes, mise en évidence par une accumulation lipidique, ce qui était le premier objectif de la thèse. Ceci a permis de valider notre modèle d'étude pour nos trois autres objectifs, focalisés sur des études fonctionnelles. Nous avons démontré les défauts électrophysiologiques, calciques et mécaniques de notre modèle et validé l'utilisation de molécules anti-arythmiques, ce qui constitue notre deuxième objectif. Cependant, nous voulions aussi étudier des traitements préventifs dans la cadre de la CA et pour cela nous avons ciblé différentes voies de signalisation, dont la voie PPAR γ et le système RAA. Dans notre troisième objectif, nous avons montré que la voie PPAR γ était central dans les défauts fonctionnels dans notre modèle de CA. Nous avons vu qu'une inhibition précoce et à long terme était nécessaire, mais nous n'avons pas testé si l'inhibiteur de PPAR γ pouvait corriger les défauts fonctionnels. Pour cela, nous pourrions incuber l'inhibiteur entre J60 et J100 chez les hiPSC-CM mutés DSC2. De plus, il serait intéressant d'observer, par MET, l'effet de cet inhibiteur sur la morphologie cellulaire,

l'appareil contractile et l'apparition de lipides. Enfin, notre dernier objectif était d'étudier l'effet de la spironolactone et l'AC (inhibiteur du système RAA), au niveau cellulaire. Ces molécules sont capables de normaliser la densité des courants potassiques et, de ce fait, prévenir la dispersion de la repolarisation. Cependant, son effet direct sur le système RAA n'est pas possible sur un modèle cellulaire. Il pourrait être envisagé d'étudier cet aspect sur un modèle animal de CA. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence le rôle de voies de signalisation dans le développement de la CA. On peut conclure que le ciblage de ces voies de signalisation pourrait être pris en considération dans les prochains développements de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de la CA. Ces études permettent une meilleure compréhension de l'apparition des arythmies lors d'une mutation sur un gène desmosomal (figure 28). En effet, plusieurs éléments sont maintenant à prendre en compte pour prévenir le risque d'arythmies chez le patient. Le cœur subit un remodelage morphologique qui crée des blocs de conduction propice aux arythmies. L'accumulation lipidique, combinée aux changements électriques et calciques, favorise le déclenchement et le maintien des arythmies. Ces différents éléments doivent donc être pris en compte pour traiter le plus efficacement les patients atteints de la CA.

Pour aller plus loin au cours de cette thèse, nous aurions pu induire artificiellement un stress mécanique à notre modèle cellulaire. La CA touche beaucoup le jeune athlète, il serait intéressant de voir si ce stress mécanique aggrave le développement de la pathologie. De plus, quelques études relatent l'implication de cytokines pro-inflammatoires dans la progression de la CA. Nous aurions pu comparer le surnageant des cellules en culture en condition contrôle et mutée pour la DSC2. Ceci dans le but d'étudier si les cellules sécrètent, dans leur microenvironnement, des facteurs pro-inflammatoires. Dans ce contexte, nous aurions pu tenter d'induire ou de ralentir la pathologie, en échangeant le surnageant de culture des cellules mutées avec celui des cellules contrôles. Ces expériences auraient pu, soit induire la pathologie dans les hiPSC-CM contrôles, soit ralentir la pathologie dans les hiPSC-CM du patient. La découverte potentielle de cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant pourrait fournir un outil de diagnostic supplémentaire dans le cadre de la CA, comme ceci a été suggéré dans une précédente étude (Campuzano et al. 2012).

F. Conclusion

Mes travaux au cours de ces trois années de thèse se sont inscrits dans une démarche visant à mieux comprendre l'apparition d'arythmie dans le cadre de la cardiomyopathie arythmogène. Cette thèse m'a permis d'adopter une démarche scientifique et d'acquérir la maîtrise de techniques visant à identifier les propriétés électriques, calciques, mécaniques et d'expression génique impliquée. J'ai pu approfondir mes connaissances en électrophysiologie et approfondi, d'un point de vue technique, le patch-clamp. J'ai aussi acquis de solides compétences en culture cellulaire, avec un modèle cellulaire de CA à partir d'hiPSC qui requiert une grande rigueur et beaucoup de patience. Ce modèle permet d'examiner les troubles phénotypiques ciblés sur le cardiomyocyte et présente l'avantage d'étudier une mutation spécifique d'un patient. Ceci offre une fabuleuse opportunité dans un contexte d'émergence du concept de médecine personnalisée.

Il a été intéressant de voir au cours de cette thèse que le phénotype observé en clinique chez un patient, peut être expliqué au niveau cellulaire à partir des cellules de ce même patient. Au cours de cette étude, j'ai pu observer que les problèmes arythmiques chez le patient proviennent de troubles au niveau cellulaire (figure 28). Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une transdifférenciation des cardiomyocytes en adipocytes, avec notamment une accumulation lipidique spécifiquement dans les cellules portant la mutation R132C sur le gène codant pour la DSC2. Ces cellules arborent une fonction électrique perturbée avec notamment un PA raccourci. Enfin, les dynamiques calciques dans ce modèle sont aussi altérées où des étincelles calciques aberrantes sont retrouvées dans notre modèle de CA. La combinaison de ces trois altérations, morphologique, électrique et calcique, nous permet d'expliquer pourquoi la fonction contractile est perturbée, avec un pourcentage d'arythmies accru dans nos hiPSC-CM mutées DSC2 (figure 28). Pour résumer, l'accumulation lipidique, un trouble de la repolarisation et l'augmentation de sparks calciques donnent un environnement pro-arythmiques. Le déclenchement et le maintien des arythmies dans la CA sont donc multifactoriels et ne dépendent pas seulement d'un remplacement fibro-adipeux (figure 28).

Enfin, mes travaux de thèses ont permis de mieux comprendre l'effet des traitements (sotalol et flécaïnide) prescrits chez le patient. Cependant, ces traitements préviennent juste l'apparition d'arythmies et ne ciblent pas le problème de fond, à savoir un remodelage structural et électrophysiologique. En outre, mes travaux constituent un rationnel et une base solides pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, avec notamment la voie de signalisation PPAR γ et l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (figure 28). Ces

nouvelles pistes permettraient de réduire la survenue des arythmies tout en réduisant le remplacement fibro-adipeux, dans le but d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients atteints de la CA.

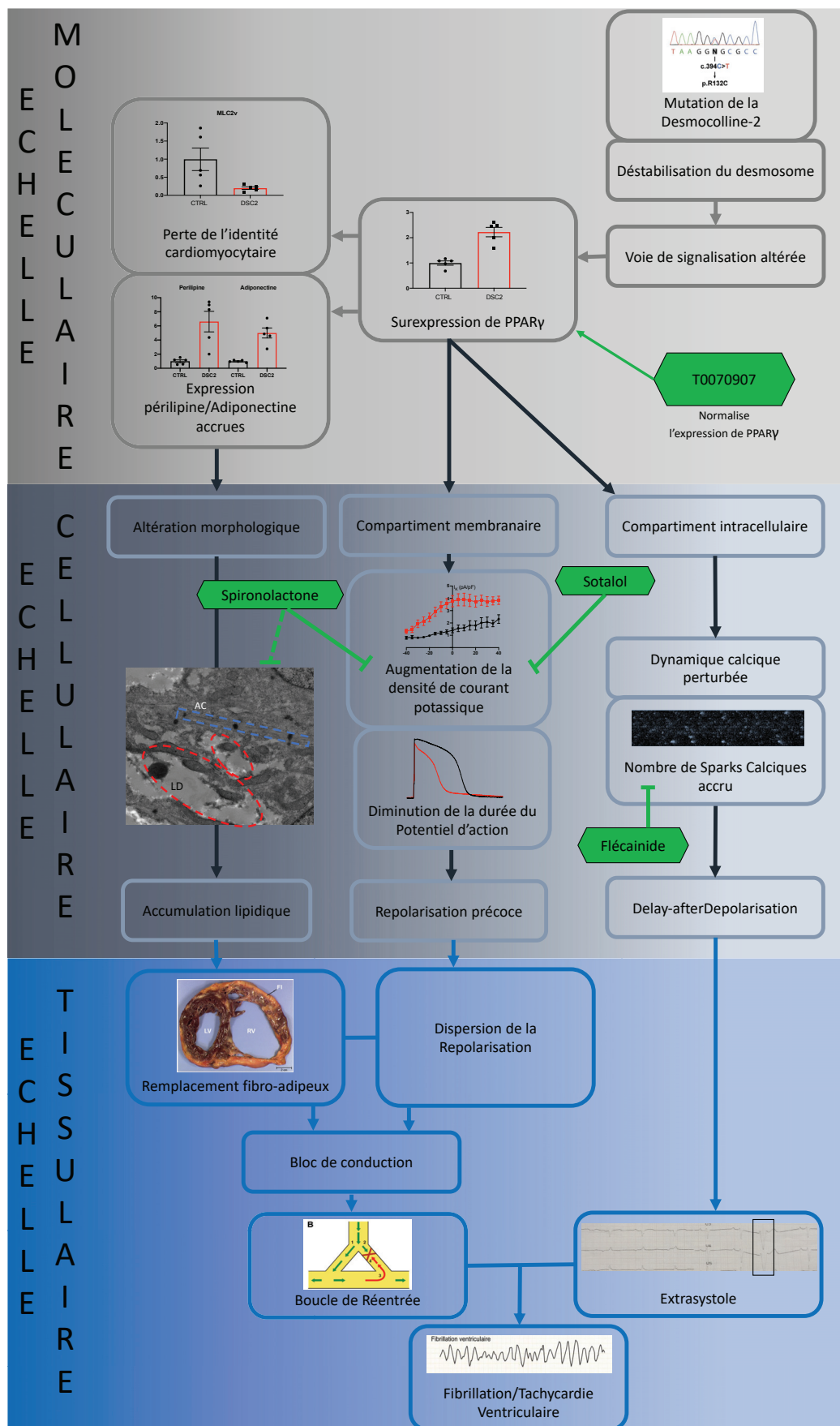


Figure 28 : Schéma bilan des principaux troubles entrainant une arythmie ventriculaire dans le cadre de la CA et les principaux traitements préventifs étudiés au cours de cette thèse

G. Bibliographie

Abilez, Oscar J., Evangeline Tzatzalos, Huaxiao Yang, Ming-Tao Zhao, Gwanghyun Jung, Alexander M. Zöllner, Malte Tiburcy, et al. 2018. "Passive Stretch Induces Structural and Functional Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 36 (2): 265–77. <https://doi.org/10.1002/stem.2732>.

Ahmadian, Maryam, Jae Myoung Suh, Nasun Hah, Christopher Liddle, Annette R Atkins, Michael Downes, and Ronald M Evans. 2013. "PPAR γ Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future." *Nature Medicine* 19 (5): 10.1038/nm.3159. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>.

Akdis, Deniz, Argelia Medeiros-Domingo, Anna Gaertner-Rommel, Jeannette I. Kast, Frank Enseleit, Peter Bode, Karin Klingel, et al. 2016. "Myocardial Expression Profiles of Candidate Molecules in Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Compared to Those with Dilated Cardiomyopathy and Healthy Controls." *Heart Rhythm* 13 (3): 731–41. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.11.010>.

Akin, Brandy L., Thomas D. Hurley, Zhenhui Chen, and Larry R. Jones. 2013. "The Structural Basis for Phospholamban Inhibition of the Calcium Pump in Sarcoplasmic Reticulum." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30181–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501585>.

Amati, G. d', C. R. di Gioia, C. Giordano, and P. Gallo. 2000. "Myocyte Transdifferentiation: A Possible Pathogenetic Mechanism for Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 124 (2): 287–90. <https://doi.org/10.5858/2000-124-0287-MT>.

An, Zhengzhe, Sridhar Muthusami, Jae-Ran Yu, and Woo-Yoon Park. 2014. "T0070907, a PPAR γ Inhibitor, Induced G2/M Arrest Enhances the Effect of Radiation in Human Cervical Cancer Cells through Mitotic Catastrophe." *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 21 (11): 1352–61. <https://doi.org/10.1177/1933719114525265>.

Asimaki, Angeliki, Sudhir Kapoor, Eva Plovie, Anne Karin Arndt, Edward Adams, ZhenZhen Liu, Cynthia A. James, et al. 2014. "Identification of a New Modulator of the Intercalated Disc in a Zebrafish Model of Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *Science Translational Medicine* 6 (240): 240ra74. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008008>.

Asimaki, Angeliki, Andre G. Kleber, and Jeffrey E. Saffitz. 2015. "Pathogenesis of Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *The Canadian Journal of Cardiology* 31 (11): 1313–24. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.04.012>.

Asimaki, Angeliki, Alexandros Protonotarios, Cynthia A. James, Stephen P. Chelko, Crystal Tichnell, Brittney Murray, Adalena Tsatsopoulou, et al. 2016. "Characterizing the Molecular Pathology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Patient Buccal Mucosa Cells." *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 9 (2): e003688. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003688>.

Asimaki, Angeliki, Petros Syrris, Thomas Wichter, Paul Matthias, Jeffrey E. Saffitz, and William J. McKenna. 2007. "A Novel Dominant Mutation in Plakoglobin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *The American Journal of Human*

Genetics 81 (5): 964–73. <https://doi.org/10.1086/521633>.

Austin, Karyn M., Michael A. Trembley, Stephanie F. Chandler, Stephen P. Sanders, Jeffrey E. Saffitz, Dominic J. Abrams, and William T. Pu. 2019a. “Molecular Mechanisms of Arrhythmogenic Cardiomyopathy.” *Nature Reviews. Cardiology* 16 (9): 519–37. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0200-7>.

Awad, Mark M., Darshan Dalal, Eunpi Cho, Nuria Amat-Alarcon, Cynthia James, Crystal Tichnell, April Tucker, et al. 2006. “DSG2 Mutations Contribute to Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy.” *American Journal of Human Genetics* 79 (1): 136–42. <https://doi.org/10.1086/504393>.

Bai, Rong, Luigi Di Biase, Kalyanam Shivkumar, Prasant Mohanty, Roderick Tung, Pasquale Santangeli, Luis Carlos Saenz, et al. 2011. “Ablation of Ventricular Arrhythmias in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Arrhythmia-Free Survival after Endo-Epicardial Substrate Based Mapping and Ablation.” *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 4 (4): 478–85. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.963066>.

Baker, K. M., and J. F. Aceto. 1990. “Angiotensin II Stimulation of Protein Synthesis and Cell Growth in Chick Heart Cells.” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 259 (2): H610–18. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.2.H610>.

Baltogiannis, Giannis G., Dimitrios N. Lysitsas, Giacomo di Giovanni, Giuseppe Ciconte, Juan Sieira, Giulio Conte, Theofilos M. Kolettis, Gian-Battista Chierchia, Carlo de Asmundis, and Pedro Brugada. 2019. “CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature.” *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 6 (July): 92. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00092>.

Ban, Ayako, Keitaro Yamanouchi, Takashi Matsuwaki, and Masugi Nishihara. 2008a. “In Vivo Gene Transfer of PPAR Gamma Is Insufficient to Induce Adipogenesis in Skeletal Muscle.” *The Journal of Veterinary Medical Science* 70 (8): 761–67. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.761>.

Basso, C., G. Thiene, D. Corrado, A. Angelini, A. Nava, and M. Valente. 1996. “Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Dysplasia, Dystrophy, or Myocarditis?” *Circulation* 94 (5): 983–91. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.5.983>.

Basso, Cristina, Domenico Corrado, Barbara Bauce, and Gaetano Thiene. 2012. “Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 5 (6): 1233–46. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962035>.

Basso, Cristina, Domenico Corrado, Frank I. Marcus, Andrea Nava, and Gaetano Thiene. 2009. “Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Lancet (London, England)* 373 (9671): 1289–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60256-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60256-7).

Basso, Cristina, Elzbieta Czarnowska, Mila Della Barbera, Barbara Bauce, Giorgia Beffagna, Elzbieta K. Wlodarska, Kalliopi Pilichou, et al. 2006. “Ultrastructural Evidence of Intercalated Disc Remodelling in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: An Electron Microscopy Investigation on Endomyocardial Biopsies.” *European Heart Journal* 27 (15): 1847–54. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl095>.

Bauce, Barbara, Alessandra Rampazzo, Cristina Basso, Elisa Mazzotti, Ilaria Rigato, Alexandros Steriotis, Giorgia Beffagna, et al. 2011. “Clinical Phenotype and Diagnosis of

Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Pediatric Patients Carrying Desmosomal Gene Mutations.” *Heart Rhythm* 8 (11): 1686–95.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.06.026>.

Beffagna, Giorgia, Gianluca Occhi, Andrea Nava, Libero Vitiello, Andrea Ditadi, Cristina Basso, Barbara Bauce, et al. 2005. “Regulatory Mutations in Transforming Growth Factor-Beta3 Gene Cause Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 1.” *Cardiovascular Research* 65 (2): 366–73. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.10.005>.

Bermúdez-Jiménez, Francisco José, Víctor Carriel, Andreas Brodehl, Miguel Alaminos, Antonio Campos, Ilona Schirmer, Hendrik Milting, et al. 2018. “Novel Desmin Mutation p.Glu401Asp Impairs Filament Formation, Disrupts Cell Membrane Integrity, and Causes Severe Arrhythmogenic Left Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia.” *Circulation* 137 (15): 1595–1610. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028719>.

Bers, D. M., and E. Perez-Reyes. 1999. “Ca Channels in Cardiac Myocytes: Structure and Function in Ca Influx and Intracellular Ca Release.” *Cardiovascular Research* 42 (2): 339–60. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00038-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00038-3).

Bers, Donald M. 2002. “Cardiac Excitation-Contraction Coupling.” *Nature* 415 (6868): 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>.

Blom, Lennart J., Anneline S. J. M. Te Riele, Aryan Vink, Richard N. W. Hauer, and Rutger J. Hassink. 2019. “Late Evolution of Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Patients with Initial Presentation as Idiopathic Ventricular Fibrillation.” *HeartRhythm Case Reports* 5 (1): 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.hrcr.2018.10.003>.

Boogaard, Malou van den, Jan Hendrik van Weerd, Amira C. Bawazeer, Ingeborg B. Hooijkaas, Harmen J. G. van de Werken, Federico Tessadori, Wouter de Laat, Phil Barnett, Jeroen Bakkers, and Vincent M. Christoffels. 2019. “Identification and Characterization of a Transcribed Distal Enhancer Involved in Cardiac Kcnh2 Regulation.” *Cell Reports* 28 (10): 2704–2714.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.007>.

Brewer, Kathryn R., Georg Kuenze, Carlos G. Vanoye, Alfred L. George, Jens Meiler, and Charles R. Sanders. 2020. “Structures Illuminate Cardiac Ion Channel Functions in Health and in Long QT Syndrome.” *Frontiers in Pharmacology* 11: 550.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00550>.

Brieler, Jay, Matthew A. Breeden, and Jane Tucker. 2017. “Cardiomyopathy: An Overview.” *American Family Physician* 96 (10): 640–46.

Brown, H. F., D. DiFrancesco, and S. J. Noble. 1979. “How Does Adrenaline Accelerate the Heart?” *Nature* 280 (5719): 235–36. <https://doi.org/10.1038/280235a0>.

Burridge, Paul W., David Anderson, Helen Priddle, Maria D. Barbadillo Muñoz, Sarah Chamberlain, Cinzia Allegrucci, Lorraine E. Young, and Chris Denning. 2007. “Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (4): 929–38.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0598>.

Burridge, Paul W., Gordon Keller, Joseph D. Gold, and Joseph C. Wu. 2012. “Production of de Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct

- Reprogramming.” *Cell Stem Cell* 10 (1): 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.013>.
- Burridge, Paul W., Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C. Lin, Jared M. Churko, Antje D. Ebert, Feng Lan, et al. 2014. “Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes.” *Nature Methods* 11 (8): 855–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>.
- Campuzano Oscar, Alcalde Mireia, Iglesias Anna, Barahona-Dussault Catherine, Sarquella-Brugada Georgia, Benito Begona, Arzamendi Dabit, Flores Jose, Leung Ki Tack, Talajic Mario, Oliva Antonio, Brugada Ramon. 2012. “Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: severe structural alterations are associated with inflammation.” *Journal of Clinical pathology* 65 (12): 1077–83. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201022>.
- Caspi, Oren, Irit Huber, Amira Gepstein, Gil Arbel, Leonid Maizels, Monther Boulos, and Lior Gepstein. 2013. “Modeling of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Circulation. Cardiovascular Genetics* 6 (6): 557–68. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000188>.
- Castelletti, Silvia, Annina S. Vischer, Petros Syrris, Lia Crotti, Carla Spazzolini, Alice Ghidoni, Gianfranco Parati, et al. 2017. “Desmoplakin Missense and Non-Missense Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Genotype-Phenotype Correlation.” *International Journal of Cardiology* 249 (December): 268–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.05.018>.
- Cerrone, Marina, and Mario Delmar. 2014. “Desmosomes and the Sodium Channel Complex: Implications for Arrhythmogenic Cardiomyopathy and Brugada Syndrome.” *Trends in Cardiovascular Medicine* 24 (5): 184–90. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.02.001>.
- Cerrone, Marina, Jerome Montnach, Xianming Lin, Yan-Ting Zhao, Mingliang Zhang, Esperanza Agullo-Pascual, Alejandra Leo-Macias, et al. 2017. “Plakophilin-2 Is Required for Transcription of Genes That Control Calcium Cycling and Cardiac Rhythm.” *Nature Communications* 8 (1): 106. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00127-0>.
- Cerrone, Marina, Maartje Noorman, Xianming Lin, Halina Chkourko, Feng-Xia Liang, Roel van der Nagel, Thomas Hund, et al. 2012a. “Sodium Current Deficit and Arrhythmogenesis in a Murine Model of Plakophilin-2 Haploinsufficiency.” *Cardiovascular Research* 95 (4): 460–68. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs218>.
- Chan, Yau-Chi, Sherwin Ting, Yee-Ki Lee, Kwong-Man Ng, Jiao Zhang, Zi Chen, Chung-Wah Siu, Steve K. W. Oh, and Hung-Fat Tse. 2013. “Electrical Stimulation Promotes Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells.” *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6 (6): 989–99. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9510-z>.
- Charpentier, E., R. M. Lavker, E. Acquista, and P. Cowin. 2000. “Plakoglobin Suppresses Epithelial Proliferation and Hair Growth in Vivo.” *The Journal of Cell Biology* 149 (2): 503–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.503>.
- Chen, Hua, You-Fu Wang, Zhong-Duo Yang, and Yuan-Chao Li. 2006. “Isolation and Identification of Novel Impurities in Spironolactone.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (5): 1263–67. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.09.003>.
- Chen, Suet Nee, Priyatansh Gurha, Raffaella Lombardi, Alessandra Ruggiero, James T. Willerson, and A. J. Marian. 2014a. “The Hippo Pathway Is Activated and Is a Causal

Mechanism for Adipogenesis in Arrhythmogenic Cardiomyopathy.” *Circulation Research* 114 (3): 454–68. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302810>.

Chen, Xinyu, Stefan Bonne, Mechthild Hatzfeld, Frans van Roy, and Kathleen J. Green. 2002. “Protein Binding and Functional Characterization of Plakophilin 2. Evidence for Its Diverse Roles in Desmosomes and Beta -Catenin Signaling.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 10512–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108765200>.

Chitaev, N. A., R. E. Leube, R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, W. W. Franke, and S. M. Troyanovsky. 1996. “The Binding of Plakoglobin to Desmosomal Cadherins: Patterns of Binding Sites and Topogenic Potential.” *The Journal of Cell Biology* 133 (2): 359–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.359>.

Choi, Hee-Jung, Shaun Park-Snyder, Lauren T. Pascoe, Kathleen J. Green, and William I. Weis. 2002. “Structures of Two Intermediate Filament-Binding Fragments of Desmoplakin Reveal a Unique Repeat Motif Structure.” *Nature Structural Biology* 9 (8): 612–20. <https://doi.org/10.1038/nsb818>.

Cohen, Ethan David, Zhishan Wang, John J. Lepore, Min Min Lu, Makoto M. Taketo, Douglas J. Epstein, and Edward E. Morrisey. 2007. “Wnt/Beta-Catenin Signaling Promotes Expansion of Isl-1-Positive Cardiac Progenitor Cells through Regulation of FGF Signaling.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (7): 1794–1804. <https://doi.org/10.1172/JCI31731>.

Corrado, Domenico, Cristina Basso, and Daniel P. Judge. 2017. “Arrhythmogenic Cardiomyopathy.” *Circulation Research* 121 (7): 784–802. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309345>.

Corrado, Domenico, Cristina Basso, and Gaetano Thiene. 2009. “Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: An Update.” *Heart (British Cardiac Society)* 95 (9): 766–73. <https://doi.org/10.1136/hrt.2008.149823>.

Corrado, Domenico, Thomas Wichter, Mark S. Link, Richard Hauer, Frank Marchlinski, Aris Anastasakis, Barbara Bauce, et al. 2015. “Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement.” *European Heart Journal* 36 (46): 3227–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv162>.

Crawford, D. C., A. V. Chobanian, and P. Brecher. 1994. “Angiotensin II Induces Fibronectin Expression Associated with Cardiac Fibrosis in the Rat.” *Circulation Research* 74 (4): 727–39. <https://doi.org/10.1161/01.res.74.4.727>.

Cristancho, Ana G., and Mitchell A. Lazar. 2011. “Forming Functional Fat: A Growing Understanding of Adipocyte Differentiation.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (11): 722–34. <https://doi.org/10.1038/nrm3198>.

Cruz, Francisco M., David Sanz-Rosa, Marta Roche-Molina, Jaime García-Prieto, José M. García-Ruiz, Gonzalo Pizarro, Luis J. Jiménez-Borreguero, et al. 2015. “Exercise Triggers ARVC Phenotype in Mice Expressing a Disease-Causing Mutated Version of Human Plakophilin-2.” *Journal of the American College of Cardiology* 65 (14): 1438–50. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.045>.

Dai, Dao-Fu, Maria Elena Danoviz, Brian Wiczer, Michael A. Laflamme, and Rong Tian. 2017. “Mitochondrial Maturation in Human Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes.” *Stem Cells International* 2017: 5153625. <https://doi.org/10.1155/2017/5153625>.

- Dalal, Darshan, Rahul Jain, Harikrishna Tandri, Jun Dong, Shaker M. Eid, Kalpana Prakasa, Crystal Tichnell, et al. 2007. "Long-Term Efficacy of Catheter Ablation of Ventricular Tachycardia in Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 50 (5): 432–40. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.049>.
- Delmar, Mario, and William J. McKenna. 2010. "The Cardiac Desmosome and Arrhythmogenic Cardiomyopathies: From Gene to Disease." *Circulation Research* 107 (6): 700–714. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223412>.
- Delva Emmanuella, Tucker Dana K. and Kowalczyk. 2009. "The desmosome." *Cold spring harbor perspectives in biology* 1(2) (August): <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>
- Di Pasquale, E., F. Lodola, M. Miragoli, M. Denegri, J. E. Avelino-Cruz, M. Buonocore, H. Nakahama, et al. 2013. "CaMKII Inhibition Rectifies Arrhythmic Phenotype in a Patient-Specific Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Cell Death & Disease* 4 (October): e843. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.369>.
- DiFrancesco, D. 1993. "Pacemaker Mechanisms in Cardiac Tissue." *Annual Review of Physiology* 55: 455–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.002323>.
- Djouadi, Fatima, garcia Lecarpentier, Jean-Louis Hébert, Philippe Charron, Jean Bastin, and Catherine Coirault. 2009. "A Potential Link between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Signalling and the Pathogenesis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Cardiovascular Research* 84 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp183>.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler. 1985. "The in Vitro Development of Blastocyst-Derived Embryonic Stem Cell Lines: Formation of Visceral Yolk Sac, Blood Islands and Myocardium." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87 (June): 27–45.
- Drawnel, Faye M., Stefano Boccardo, Michael Prummer, Frédéric Delobel, Alexandra Graff, Michael Weber, Régine Gérard, et al. 2014. "Disease Modeling and Phenotypic Drug Screening for Diabetic Cardiomyopathy Using Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Reports* 9 (3): 810–21. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.055>.
- El-Battrawy, Ibrahim, Zhihan Zhao, Huan Lan, Lukas Cyganek, Christoph Tombers, Xin Li, Fanis Buljubasic, et al. 2018a. "Electrical Dysfunctions in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes from a Patient with an Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology* 20 (F11): f46–56. <https://doi.org/10.1093/europace/euy042>.
- Ermakov, Simon, and Melvin Scheinman. 2015. "Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy - Antiarrhythmic Therapy." *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 4 (2): 86–89. <https://doi.org/10.15420/aer.2015.04.02.86>.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292 (5819): 154–56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Fabiato, A. 1983. "Calcium-Induced Release of Calcium from the Cardiac Sarcoplasmic

Reticulum.” *The American Journal of Physiology* 245 (1): C1-14.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1>.

Farré, Jerónimo, and Hein J. Wellens. 2004. “Philippe Coumel: A Founding Father of Modern Arrhythmology.” *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology* 6 (5): 464–65.
<https://doi.org/10.1016/j.eupc.2004.06.001>.

Fayssoil, Abdallah, Olivier Nardi, David Orlikowski, and Djillali Annane. 2010. “Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy: Pathogenesis and Therapeutics.” *Heart Failure Reviews* 15 (1): 103–7. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9156-8>.

Fernández-Falgueras, Anna, Georgia Sarquella-Brugada, Josep Brugada, Ramon Brugada, and Oscar Campuzano. 2017. “Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances.” *Biology* 6 (1): E7. <https://doi.org/10.3390/biology6010007>.

Fletcher, R. D., G. B. Cintron, G. Johnson, J. Orndorff, P. Carson, and J. N. Cohn. 1993. “Enalapril Decreases Prevalence of Ventricular Tachycardia in Patients with Chronic Congestive Heart Failure. The V-HeFT II VA Cooperative Studies Group.” *Circulation* 87 (6 Suppl): VI49-55.

Freund, Christian, Dorien Ward-van Oostwaard, Jantine Monshouwer-Kloots, Stieneke van den Brink, Marga van Rooijen, Xiuqin Xu, Robert Zweigerdt, Christine Mummery, and Robert Passier. 2008. “Insulin Redirects Differentiation from Cardiogenic Mesoderm and Endoderm to Neuroectoderm in Differentiating Human Embryonic Stem Cells.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (3): 724–33. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0617>.

Fujita, Shuichi, Fumio Terasaki, Kaoru Otsuka, Takashi Katashima, Yumiko Kanzaki, Keishiro Kawamura, Takao Tanaka, and Yasushi Kitaura. 2008. “Markedly Increased Intracellular Lipid Droplets and Disruption of Intercellular Junctions in Biopsied Myocardium from a Patient with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Heart and Vessels* 23 (6): 440–44. <https://doi.org/10.1007/s00380-008-1079-0>.

Gaita, Fiorenzo, Carla Giustetto, Francesca Bianchi, Christian Wolpert, Rainer Schimpf, Riccardo Riccardi, Stefano Grossi, Elena Richiardi, and Martin Borggrefe. 2003. “Short QT Syndrome: A Familial Cause of Sudden Death.” *Circulation* 108 (8): 965–70.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085071.28695.C4>.

Garcia-Gras, Eduardo, Raffaella Lombardi, Michael J. Giocondo, James T. Willerson, Michael D. Schneider, Dirar S. Khoury, and Ali J. Marian. 2006a. “Suppression of Canonical Wnt/Beta-Catenin Signaling by Nuclear Plakoglobin Recapitulates Phenotype of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 2012–21. <https://doi.org/10.1172/JCI27751>.

Gardiner, Peter, Kathy Schrode, David Quinlan, Bernard K. Martin, Donald R. Boreham, Maurice S. Rogers, Katherine Stubbs, Margaret Smith, and Aziz Karim. 1989. “Spironolactone Metabolism: Steady-State Serum Levels of the Sulfur-Containing Metabolites.” *The Journal of Clinical Pharmacology* 29 (4): 342–47.
<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1989.tb03339.x>.

Garrod, David, and Martyn Chidgey. 2008. “Desmosome Structure, Composition and Function.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (3): 572–87.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>.

Gat, U., R. DasGupta, L. Degenstein, and E. Fuchs. 1998. "De Novo Hair Follicle Morphogenesis and Hair Tumors in Mice Expressing a Truncated Beta-Catenin in Skin." *Cell* 95 (5): 605–14. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81631-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81631-1).

Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, and I. Johnson. 2000. "Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca(2+)-Indicator Dyes." *Cell Calcium* 27 (2): 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>.

Gehmlich, Katja, Petros Syrris, Emma Peskett, Alison Evans, Elisabeth Ehler, Angeliki Asimaki, Aris Anastasakis, et al. 2011. "Mechanistic Insights into Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Desmocollin-2 Mutations." *Cardiovascular Research* 90 (1): 77–87. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq353>.

Gerçek, Mustafa, Muhammed Gerçek, Sebastian Kant, Sakine Simseyilmaz, Astrid Kassner, Hendrik Milting, Elisa A. Liehn, Rudolf E. Leube, and Claudia A. Krusche. 2017. "Cardiomyocyte Hypertrophy in Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *The American Journal of Pathology* 187 (4): 752–66. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.018>.

Gerull, Brenda, Arnd Heuser, Thomas Wichter, Matthias Paul, Craig T. Basson, Deborah A. McDermott, Bruce B. Lerman, et al. 2004. "Mutations in the Desmosomal Protein Plakophilin-2 Are Common in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Nature Genetics* 36 (11): 1162–64. <https://doi.org/10.1038/ng1461>.

Giudicessi, John R., and Michael J. Ackerman. 2012. "Potassium-Channel Mutations and Cardiac Arrhythmias--Diagnosis and Therapy." *Nature Reviews. Cardiology* 9 (6): 319–32. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.3>.

Godsel, Lisa M., Sherry N. Hsieh, Evangeline V. Amargo, Amanda E. Bass, Lauren T. Pascoe-McGillicuddy, Arthur C. Huen, Meghan E. Thorne, et al. 2005. "Desmoplakin Assembly Dynamics in Four Dimensions: Multiple Phases Differentially Regulated by Intermediate Filaments and Actin." *The Journal of Cell Biology* 171 (6): 1045–59. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510038>.

Gomes, John, Malcolm Finlay, Akbar K. Ahmed, Edward J. Ciaccio, Angeliki Asimaki, Jeffrey E. Saffitz, Giovanni Quarta, et al. 2012. "Electrophysiological Abnormalities Precede Overt Structural Changes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Due to Mutations in Desmoplakin-A Combined Murine and Human Study." *European Heart Journal* 33 (15): 1942–53. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr472>.

Grant, Augustus O. 2009. "Cardiac Ion Channels." *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 2 (2): 185–94. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.789081>.

Granzier, Henk, Yiming Wu, Labeit Siegfried, and Martin LeWinter. 2005. "Titin: Physiological Function and Role in Cardiomyopathy and Failure." *Heart Failure Reviews* 10 (3): 211–23. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-5251-7>.

Green, Kathleen J., Spiro Getsios, Sergey Troyanovsky, and L. M. Godsel. 2010. "Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (2): a000125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000125>.

Green, Kathleen J., and Cory L. Simpson. 2007. "Desmosomes: New Perspectives on a

Classic.” *The Journal of Investigative Dermatology* 127 (11): 2499–2515.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701015>.

Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. “Understanding Adipocyte Differentiation.” *Physiological Reviews* 78 (3): 783–809.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.

Groeneweg, J. A., J. F. van der Heijden, D. Dooijes, T. a. B. van Veen, J. P. van Tintelen, and R. N. Hauer. 2014. “Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Diagnosis, Genetic Background, and Risk Management.” *Netherlands Heart Journal: Monthly Journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 22 (7–8): 316–25.
<https://doi.org/10.1007/s12471-014-0563-7>.

Groeneweg, Judith A., Aditya Bhonsale, Cynthia A. James, Anneline S. te Riele, Dennis Dooijes, Crystal Tichnell, Brittney Murray, et al. 2015. “Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members.” *Circulation. Cardiovascular Genetics* 8 (3): 437–46. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.001003>.

Grossmann, Katja S., Christine Grund, Joerg Huelsken, Martin Behrend, Bettina Erdmann, Werner W. Franke, and Walter Birchmeier. 2004. “Requirement of Plakophilin 2 for Heart Morphogenesis and Cardiac Junction Formation.” *The Journal of Cell Biology* 167 (1): 149–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402096>.

Hatzfeld, Mechthild. 2007. “Plakophilins: Multifunctional Proteins or Just Regulators of Desmosomal Adhesion?” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (1): 69–77.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.009>.

Heallen, Todd, Yuka Morikawa, John Leach, Ge Tao, James T. Willerson, Randy L. Johnson, and James F. Martin. 2013. “Hippo Signaling Impedes Adult Heart Regeneration.” *Development (Cambridge, England)* 140 (23): 4683–90. <https://doi.org/10.1242/dev.102798>.

Heuser, Arnd, Eva R. Plovie, Patrick T. Ellinor, Katja S. Grossmann, Jordan T. Shin, Thomas Wichter, Craig T. Basson, et al. 2006. “Mutant Desmocollin-2 Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *American Journal of Human Genetics* 79 (6): 1081–88.
<https://doi.org/10.1086/509044>.

Hilliard, Fredrick A., Derek S. Steele, Derek Laver, Zhaokang Yang, Sylvain J. Le Marchand, Nagesh Chopra, David W. Piston, Sabine Huke, and Björn C. Knollmann. 2010. “Flecainide Inhibits Arrhythmogenic Ca²⁺ Waves by Open State Block of Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels and Reduction of Ca²⁺ Spark Mass.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.10.005>.

Hinson, John T., Anant Chopra, Navid Nafissi, William J. Polacheck, Craig C. Benson, Sandra Swist, Joshua Gorham, et al. 2015. “HEART DISEASE. Titin Mutations in IPS Cells Define Sarcomere Insufficiency as a Cause of Dilated Cardiomyopathy.” *Science (New York, N.Y.)* 349 (6251): 982–86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5458>.

Hirt, Marc N., Arne Hansen, and Thomas Eschenhagen. 2014. “Cardiac Tissue Engineering: State of the Art.” *Circulation Research* 114 (2): 354–67.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300522>.

Honda, Masaki, Jumpei Kiyokawa, Mitsuyasu Tabo, and Tomoaki Inoue. 2011a.

“Electrophysiological Characterization of Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Journal of Pharmacological Sciences* 117 (3): 149–59. <https://doi.org/10.1254/jphs.11038fp>.

Hoorntje, Edgar T., Wouter P. te Rijdt, Cynthia A. James, Kalliopi Pilichou, Cristina Basso, Daniel P. Judge, Connie R. Bezzina, and J. Peter van Tintelen. 2017. “Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Pathology, Genetics, and Concepts in Pathogenesis.” *Cardiovascular Research* 113 (12): 1521–31. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx150>.

Hou, Pingping, Yanqin Li, Xu Zhang, Chun Liu, Jingyang Guan, Honggang Li, Ting Zhao, et al. 2013. “Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds.” *Science (New York, N.Y.)* 341 (6146): 651–54. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>.

Ilic, Dusko, and Caroline Ogilvie. 2017. “Concise Review: Human Embryonic Stem Cells—What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2450>.

Itzhaki, Ilanit, Leonid Maizels, Irit Huber, Amira Gepstein, Gil Arbel, Oren Caspi, Liron Miller, et al. 2012. “Modeling of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia with Patient-Specific Human-Induced Pluripotent Stem Cells.” *Journal of the American College of Cardiology* 60 (11): 990–1000. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.02.066>.

Itzhaki, Ilanit, Sophia Rapoport, Irit Huber, Itzhak Mizrahi, Limor Zwi-Dantsis, Gil Arbel, Jackie Schiller, and Lior Gepstein. 2011. “Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes.” *PloS One* 6 (4): e18037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018037>.

Jefferson, Julius J., Carlo Ciatto, Lawrence Shapiro, and Ronald K. H. Liem. 2007. “Structural Analysis of the Plakin Domain of Bullous Pemphigoid Antigen1 (BPAG1) Suggests That Plakins Are Members of the Spectrin Superfamily.” *Journal of Molecular Biology* 366 (1): 244–57. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.036>.

Ji, Juan, Teng-Fei Xue, Xu-Dong Guo, Jin Yang, Ruo-Bing Guo, Juan Wang, Ji-Ye Huang, Xiao-Jie Zhao, and Xiu-Lan Sun. 2018. “Antagonizing Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Facilitates M1-to-M2 Shift of Microglia by Enhancing Autophagy via the LKB1-AMPK Signaling Pathway.” *Aging Cell* 17 (4): e12774. <https://doi.org/10.1111/accel.12774>.

Jung, Christian B., Alessandra Moretti, Michael Mederos y Schnitzler, Laura Iop, Ursula Storch, Milena Bellin, Tatjana Dorn, et al. 2012. “Dantrolene Rescues Arrhythmogenic RYR2 Defect in a Patient-Specific Stem Cell Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia.” *EMBO Molecular Medicine* 4 (3): 180–91. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100194>.

Jung, Gwanghyun, and Daniel Bernstein. 2014. “HiPSC Modeling of Inherited Cardiomyopathies.” *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 16 (7): 320. <https://doi.org/10.1007/s11936-014-0320-7>.

Kamakura, Tsukasa, Takeru Makiyama, Kenichi Sasaki, Yoshinori Yoshida, Yimin Wuriyanghai, Jiarong Chen, Tetsuhisa Hattori, et al. 2013. “Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture.” *Circulation Journal* 77 (5): 1307–14. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0987>.

- Karakikes, Ioannis, Mohamed Ameen, Vittavat Termglinchan, and Joseph C. Wu. 2015. "Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes." *Circulation Research* 117 (1): 80–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>.
- Karakikes, Ioannis, Grant D. Senyei, Jens Hansen, Chi-Wing Kong, Evren U. Azeloglu, Francesca Stillitano, Deborah K. Lieu, et al. 2014. "Small Molecule-Mediated Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Ventricular Cardiomyocytes." *STEM CELLS Translational Medicine* 3 (1): 18–31. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0110>.
- Karbassi, Elahesh, Aidan Fenix, Silvia Marchiano, Naoto Muraoka, Kenta Nakamura, Xiulan Yang, and Charles E. Murry. 2020. "Cardiomyocyte Maturation: Advances in Knowledge and Implications for Regenerative Medicine." *Nature Reviews. Cardiology* 17 (6): 341–59. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>.
- Karim, Aziz. 1978. "Spironolactone: Disposition, Metabolism, Pharmacodynamics, and Bioavailability." *Drug Metabolism Reviews* 8 (1): 151–88. <https://doi.org/10.3109/03602537808993782>.
- Karim, Aziz, and Edward A. Brown. 1972. "Isolation and Identification of Novel Sulfur-Containing Metabolites of Spironolactone (Aldactone®)." *Steroids* 20 (1): 41–62. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(72\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0039-128X(72)90117-1).
- Kehat, Izhak, Dorit Kenyagin-Karsenti, Mirit Snir, Hana Segev, Michal Amit, Amira Gepstein, Erella Livne, Ofer Binah, Joseph Itskovitz-Eldor, and Lior Gepstein. 2001. "Human Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Myocytes with Structural and Functional Properties of Cardiomyocytes." *Journal of Clinical Investigation* 108 (3): 407–14.
- Khalil, Hadi, Onur Kanisicak, Vikram Prasad, Robert N. Correll, Xing Fu, Tobias Schips, Ronald J. Vagnozzi, et al. 2017. "Fibroblast-Specific TGF- β -Smad2/3 Signaling Underlies Cardiac Fibrosis." *The Journal of Clinical Investigation* 127 (10): 3770–83. <https://doi.org/10.1172/JCI94753>.
- Khudiakov, Aleksandr, Anastasia Zaytseva, Kseniya Perepelina, Natalia Smolina, Tatiana Pervunina, Elena Vasichkina, Alexey Karpushev, Alexey Tomilin, Anna Malashicheva, and Anna Kostareva. 2020. "Sodium Current Abnormalities and Deregulation of Wnt/ β -Catenin Signaling in iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Patient with Arrhythmogenic Cardiomyopathy Harboring Compound Genetic Variants in Plakophilin 2 Gene." *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1866 (11): 165915. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165915>.
- Kim, Changsung, Johnson Wong, Jianyan Wen, Shirong Wang, Cheng Wang, Sean Spiering, Natalia G. Kan, et al. 2013a. "Studying Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia with Patient-Specific iPSCs." *Nature* 494 (7435): 105–10. <https://doi.org/10.1038/nature11799>.
- Kléber, André G., and Yoram Rudy. 2004. "Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias." *Physiological Reviews* 84 (2): 431–88. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2003>.
- Kohama, Yasuaki, Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Takamaru Ishizu, Tomoaki Higo, et al. 2020. "Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Delivery Promotes S-Phase Entry-Independent Precise Targeted Integration in Cardiomyocytes." *Scientific Reports* 10 (1): 15348. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72216-y>.

- Kroll, Katharina, Mamta Chabria, Ken Wang, Fabian Häusermann, Franz Schuler, and Liudmila Polonchuk. 2017. "Electro-Mechanical Conditioning of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for Translational Research." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 130 (Pt B): 212–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.003>.
- La Gerche, André, Hein Heidbüchel, Andrew T. Burns, Don J. Mooney, Andrew J. Taylor, Heinz B. Pflüger, Warrick J. Inder, Andrew I. Macisaac, and David L. Prior. 2011. "Disproportionate Exercise Load and Remodeling of the Athlete's Right Ventricle." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 43 (6): 974–81. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31820607a3>.
- Laflamme, Michael A., Kent Y. Chen, Anna V. Naumova, Veronica Muskheli, James A. Fugate, Sarah K. Dupras, Hans Reinecke, et al. 2007. "Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells in Pro-Survival Factors Enhance Function of Infarcted Rat Hearts." *Nature Biotechnology* 25 (9): 1015–24. <https://doi.org/10.1038/nbt1327>.
- Laitinen, P. J., K. M. Brown, K. Piippo, H. Swan, J. M. Devaney, B. Brahmabhatt, E. A. Donarum, et al. 2001. "Mutations of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Circulation* 103 (4): 485–90. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.4.485>.
- Lan, Feng, Andrew S. Lee, Ping Liang, Veronica Sanchez-Freire, Patricia K. Nguyen, Li Wang, Leng Han, et al. 2013. "Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 12 (1): 101–13. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.010>.
- Laustsen, Pelle G., Steven J. Russell, Lei Cui, Amelia Entingh-Pearsall, Martin Holzenberger, Rongli Liao, and C. Ronald Kahn. 2007. "Essential Role of Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Signaling in Cardiac Development and Function." *Molecular and Cellular Biology* 27 (5): 1649–64. <https://doi.org/10.1128/MCB.01110-06>.
- Lazzarini, Elisabetta, Jan D. H. Jongbloed, Kalliopi Pilichou, Gaetano Thiene, Cristina Basso, Hennie Bikker, Bart Charbon, Morris Swertz, J. Peter van Tintelen, and Paul A. van der Zwaag. 2015. "The ARVD/C Genetic Variants Database: 2014 Update." *Human Mutation* 36 (4): 403–10. <https://doi.org/10.1002/humu.22765>.
- Leask, Andrew. 2007. "TGFβ, Cardiac Fibroblasts, and the Fibrotic Response." *Cardiovascular Research* 74 (2): 207–12. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.012>.
- Leask, Andrew. 2015. "Getting to the Heart of the Matter: New Insights into Cardiac Fibrosis." *Circulation Research* 116 (7): 1269–76. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305381>.
- Lee, Gary, Fabienne Elwood, John McNally, Jennifer Weiszmänn, Michelle Lindstrom, Kate Amaral, Motonao Nakamura, et al. 2002. "T0070907, a Selective Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ, Functions as an Antagonist of Biochemical and Cellular Activities." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (22): 19649–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200743200>.
- Leenhardt, Antoine, Isabelle Denjoy, and Pascale Guicheney. 2012. "Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology* 5 (5): 1044–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962027>.

Lefterova, Martina I., Anders K. Haakonsson, Mitchell A. Lazar, and Susanne Mandrup. 2014a. "PPAR γ and the Global Map of Adipogenesis and Beyond." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 25 (6): 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.04.001>.

Li, Deqiang, Ying Liu, Mitsunori Maruyama, Wuqiang Zhu, Hanying Chen, Wenjun Zhang, Sean Reuter, et al. 2011. "Restrictive Loss of Plakoglobin in Cardiomyocytes Leads to Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *Human Molecular Genetics* 20 (23): 4582–96. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr392>.

Li, Jifen, David Swope, Natalia Raess, Lan Cheng, Eliane J. Muller, and Glenn L. Radice. 2011. "Cardiac Tissue-Restricted Deletion of Plakoglobin Results in Progressive Cardiomyopathy and Activation of β -Catenin Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 31 (6): 1134–44. <https://doi.org/10.1128/MCB.01025-10>.

Li, Michelle W. M., Dolores D. Mruk, Will M. Lee, and C. Yan Cheng. 2009. "Connexin 43 and Plakophilin-2 as a Protein Complex That Regulates Blood-Testis Barrier Dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10213–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901700106>.

Lian, Xiaojun, Jianhua Zhang, Samira M. Azarin, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Xiaoping Bao, Cheston Hsiao, Timothy J. Kamp, and Sean P. Palecek. 2013. "Directed Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells by Modulating Wnt/ β -Catenin Signaling under Fully Defined Conditions." *Nature Protocols* 8 (1): 162–75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>.

Lieve, Krystien Vv, Arthur A. Wilde, and Christian van der Werf. 2016. "The Role of Flecainide in the Management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 5 (1): 45–49. <https://doi.org/10.15420/aer.2016.3.3>.

Lin, Yongshun, and Guokai Chen. 2008. "Embryoid Body Formation from Human Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined E8 Media." In *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK424234/>.

Lin, Zhiqiang, Alexander von Gise, Pingzhu Zhou, Fei Gu, Qing Ma, Jianming Jiang, Allan L. Yau, et al. 2014. "Cardiac-Specific YAP Activation Improves Cardiac Function and Survival in an Experimental Murine MI Model." *Circulation Research* 115 (3): 354–63. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303632>.

Liu, Jiajian, Hong Wang, Ying Zuo, and Stephen R. Farmer. 2006a. "Functional Interaction between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Beta-Catenin." *Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5827–37. <https://doi.org/10.1128/MCB.00441-06>.

Liu, Nian, Marco Denegri, Yanfei Ruan, José Everardo Avelino-Cruz, Andrea Perissi, Sara Negri, Carlo Napolitano, William A. Coetzee, Penelope A. Boyden, and Silvia G. Priori. 2011. "Short Communication: Flecainide Exerts an Antiarrhythmic Effect in a Mouse Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia by Increasing the Threshold for Triggered Activity." *Circulation Research* 109 (3): 291–95. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247338>.

Logan, Catriona Y., and Roel Nusse. 2004. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>.

- Lombardi, Raffaella, Suet Nee Chen, Alessandra Ruggiero, Priyatansh Gurha, Grazyna Z. Czernuszewicz, James T. Willerson, and Ali J. Marian. 2016. "Cardiac Fibro-Adipocyte Progenitors Express Desmosome Proteins and Preferentially Differentiate to Adipocytes Upon Deletion of the Desmoplakin Gene." *Circulation Research* 119 (1): 41–54. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308136>.
- Lombardi, Raffaella, Jinjiang Dong, Gabriela Rodriguez, Achim Bell, Tack Ki Leung, Robert J. Schwartz, James T. Willerson, Ramon Brugada, and Ali J. Marian. 2009. "Genetic Fate Mapping Identifies Second Heart Field Progenitor Cells as a Source of Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Circulation Research* 104 (9): 1076–84. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.196899>.
- Lombardi, Raffaella, Maria da Graca Cabreira-Hansen, Achim Bell, Richard R. Fromm, James T. Willerson, and A. J. Marian. 2011. "Nuclear Plakoglobin Is Essential for Differentiation of Cardiac Progenitor Cells to Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *Circulation Research* 109 (12): 1342–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255075>.
- Long, Chengzu, Hui Li, Malte Tiburcy, Cristina Rodriguez-Caycedo, Viktoriia Kyrychenko, Huanyu Zhou, Yu Zhang, et al. 2018. "Correction of Diverse Muscular Dystrophy Mutations in Human Engineered Heart Muscle by Single-Site Genome Editing." *Science Advances* 4 (1): eaap9004. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap9004>.
- Lorenzon, Alessandra, Giorgia Beffagna, Barbara Bause, Marzia De Bortoli, Ilena E. A. Li Mura, Martina Calore, Emanuela Dazzo, et al. 2013. "Desmin Mutations and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *The American Journal of Cardiology* 111 (3): 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.10.017>.
- Lundy, Scott D., Wei-Zhong Zhu, Michael Regnier, and Michael A. Laflamme. 2013. "Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells and Development* 22 (14): 1991–2002. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0490>.
- Lyon, Robert C., Valeria Mezzano, Adam T. Wright, Emily Pfeiffer, Joyce Chuang, Katherine Banares, Allan Castaneda, et al. 2014. "Connexin Defects Underlie Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in a Novel Mouse Model." *Human Molecular Genetics* 23 (5): 1134–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt508>.
- Ma, Dongrui, Heming Wei, Jun Lu, Shuswen Ho, Guangqing Zhang, Xiaoming Sun, Yingzi Oh, et al. 2013. "Generation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Cellular Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *European Heart Journal* 34 (15): 1122–33. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs226>.
- Ma, Junyi, Liang Guo, Steve J. Fiene, Blake D. Anson, James A. Thomson, Timothy J. Kamp, Kyle L. Kolaja, Bradley J. Swanson, and Craig T. January. 2011. "High Purity Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Electrophysiological Properties of Action Potentials and Ionic Currents." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 301 (5): H2006–2017. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00694.2011>.
- Ma, Sai, Bo Zhou, Qian Yang, Yunzhi Pan, Wei Yang, Stephen J. Freedland, Ling-Wen Ding, et al. 2021. "A Transcriptional Regulatory Loop of Master Regulator Transcription Factors, PPAR γ , and Fatty Acid Synthesis Promotes Esophageal Adenocarcinoma." *Cancer Research*

81 (5): 1216–29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0652>.

Ma, Xiaojie, Linghao Kong, and Saiyong Zhu. 2017. “Reprogramming Cell Fates by Small Molecules.” *Protein & Cell* 8 (5): 328–48. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0362-6>.

Malan, Daniela, Miao Zhang, Birgit Stallmeyer, Jovanca Müller, Bernd K. Fleischmann, Eric Schulze-Bahr, Philipp Sasse, and Boris Greber. 2016. “Human IPS Cell Model of Type 3 Long QT Syndrome Recapitulates Drug-Based Phenotype Correction.” *Basic Research in Cardiology* 111 (2): 14. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0530-0>.

Mallat, Z., A. Tedgui, F. Fontaliran, R. Frank, M. Durigon, and G. Fontaine. 1996. “Evidence of Apoptosis in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia.” *The New England Journal of Medicine* 335 (16): 1190–96. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610173351604>.

Manfra, Ornella, Michael Frisk, and William E. Louch. 2017. “Regulation of Cardiomyocyte T-Tubular Structure: Opportunities for Therapy.” *Current Heart Failure Reports* 14 (3): 167–78. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0329-9>.

Mangoni, Matteo E., and Joël Nargeot. 2008. “Genesis and Regulation of the Heart Automaticity.” *Physiological Reviews* 88 (3): 919–82. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2007>.

Marchlinski, Francis E., Erica Zado, Sanjay Dixit, Edward Gerstenfeld, David J. Callans, Henry Hsia, David Lin, Hemal Nayak, Andrea Russo, and Ward Pulliam. 2004. “Electroanatomic Substrate and Outcome of Catheter Ablative Therapy for Ventricular Tachycardia in Setting of Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Circulation* 110 (16): 2293–98. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145154.02436.90>.

Marcus, Gregory M., David V. Glidden, Bronislava Polonsky, Wojciech Zareba, Lisa M. Smith, David S. Cannom, N. A. Mark Estes, Frank Marcus, Melvin M. Scheinman, and Multidisciplinary Study of Right Ventricular Dysplasia Investigators. 2009. “Efficacy of Antiarrhythmic Drugs in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: A Report from the North American ARVC Registry.” *Journal of the American College of Cardiology* 54 (7): 609–15. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.052>.

Maron, Barry J., and Martin S. Maron. 2013. “Hypertrophic Cardiomyopathy.” *Lancet (London, England)* 381 (9862): 242–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60397-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60397-3).

Martin, G. R. 1981. “Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.

Mast, Thomas P., Cynthia A. James, Hugh Calkins, Arco J. Teske, Crystal Tichnell, Brittney Murray, Peter Loh, et al. 2017. “Evaluation of Structural Progression in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy.” *JAMA Cardiology* 2 (3): 293–302. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.5034>.

Mathur, M., L. Goodwin, and P. Cowin. 1994. “Interactions of the Cytoplasmic Domain of the Desmosomal Cadherin Dsg1 with Plakoglobin.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (19): 14075–80.

McKoy, G., N. Protonotarios, A. Crosby, A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, A. Coonar, M.

- Norman, C. Baboonian, S. Jeffery, and W. J. McKenna. 2000. "Identification of a Deletion in Plakoglobin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair (Naxos Disease)." *Lancet (London, England)* 355 (9221): 2119–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02379-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02379-5).
- Mehra, D., M. S. Imtiaz, D. F. van Helden, B. C. Knollmann, and D. R. Laver. 2014. "Multiple Modes of Ryanodine Receptor 2 Inhibition by Flecainide." *Molecular Pharmacology* 86 (6): 696–706. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094623>.
- Merner, Nancy D., Kathy A. Hodgkinson, Annika F. M. Haywood, Sean Connors, Vanessa M. French, Jörg-Detlef Drenckhahn, Christine Kupprion, et al. 2008. "Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 5 Is a Fully Penetrant, Lethal Arrhythmic Disorder Caused by a Missense Mutation in the TMEM43 Gene." *American Journal of Human Genetics* 82 (4): 809–21. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.010>.
- Mertens, C., C. Kuhn, and W. W. Franke. 1996. "Plakophilins 2a and 2b: Constitutive Proteins of Dual Location in the Karyoplasm and the Desmosomal Plaque." *The Journal of Cell Biology* 135 (4): 1009–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.1009>.
- Mitchell, Jere H., William Haskell, Peter Snell, and Steven P. Van Camp. 2005. "Task Force 8: Classification of Sports." *Journal of the American College of Cardiology* 45 (8): 1364–67. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.015>.
- Moreau, Adrien, Mohamed Boutjdir, and Mohamed Chahine. 2017. "Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes: Cardiac Applications, Opportunities, and Challenges." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 95 (10): 1108–16. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0726>.
- Moreau, Adrien, Jean-Baptiste Reissq, Helene Delanoe-Ayari, Marion Pierre, Alexandre Janin, Antoine Deliniere, Francis Bessière, et al. 2021. "Deciphering DSC2 Arrhythmogenic Cardiomyopathy Electrical Instability: From Ion Channels to ECG and Tailored Drug Therapy." *Clinical and Translational Medicine* 11 (3): e319. <https://doi.org/10.1002/ctm2.319>.
- Morel, Elodie, Ab Waheed Manati, Patrice Nony, Delphine Maucourt-Boulch, Francis Bessière, Xu Cai, Timothee Besseyre des Horts, Alexandre Janin, Adrien Moreau, and Phillippe Chevalier. 2018. "Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia: A Double-Blind, Multicenter, Prospective, Randomized, Genotype-Driven Study (BRAVE Study)." *Clinical Cardiology* 41 (3): 300–306. <https://doi.org/10.1002/clc.22884>.
- Moretti, Alessandra, Milena Bellin, Andrea Welling, Christian Billy Jung, Jason T. Lam, Lorenz Bott-Flügel, Tatjana Dorn, et al. 2010. "Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome." *The New England Journal of Medicine* 363 (15): 1397–1409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908679>.
- Mummery, Christine L., Jianhua Zhang, Elizabeth S. Ng, David A. Elliott, Andrew G. Elefanty, and Timothy J. Kamp. 2012. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview." *Circulation Research* 111 (3): 344–58. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227512>.
- Mummery, Christine, Dorien Ward-van Oostwaard, Pieter Doevendans, Rene Spijker, Stieneke van den Brink, Rutger Hassink, Marcel van der Heyden, et al. 2003. "Differentiation

of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture with Visceral Endoderm-like Cells.” *Circulation* 107 (21): 2733–40.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000068356.38592.68>.

Nagy, Zsolt A., László Virág, András Tóth, Péter Biliczki, Károly Acsai, Tamás Bányász, Péter Nánási, Julius Gy Papp, and András Varró. 2004. “Selective Inhibition of Sodium-Calcium Exchanger by SEA-0400 Decreases Early and Delayed after Depolarization in Canine Heart.” *British Journal of Pharmacology* 143 (7): 827–31.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706026>.

Nerbonne, Jeanne M., and Robert S. Kass. 2005. “Molecular Physiology of Cardiac Repolarization.” *Physiological Reviews* 85 (4): 1205–53.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>.

Neuvonen, Pertti J., and Erkki Elonen. 2019. “Sotalol, Unlike the Other Beta-Blockers, Increases the QTc Interval and Risk of Torsades de Pointes Ventricular Tachycardia in Severe Poisonings.” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 125 (6): 487–88.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.13333>.

Numaguchi, H., F. M. Mullins, J. P. Johnson, D. C. Johns, S. S. Po, I. C. Yang, G. F. Tomaselli, and J. R. Balser. 2000. “Probing the Interaction between Inactivation Gating and Dd-Sotalol Block of HERG.” *Circulation Research* 87 (11): 1012–18.
<https://doi.org/10.1161/01.res.87.11.1012>.

Odiete, Oghenerukevwe, Michael F. Hill, and Douglas B. Sawyer. 2012. “Neuregulin in Cardiovascular Development and Disease.” *Circulation Research* 111 (10): 1376–85.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267286>.

Ojala, Marisa, Chandra Prajapati, Risto-Pekka Pölönen, Kristiina Rajala, Mari Pekkanen-Mattila, Jyrki Rasku, Kim Larsson, and Katriina Aalto-Setälä. 2016. “Mutation-Specific Phenotypes in hiPSC-Derived Cardiomyocytes Carrying Either Myosin-Binding Protein C Or α -Tropomyosin Mutation for Hypertrophic Cardiomyopathy.” *Stem Cells International* 2016: 1684792. <https://doi.org/10.1155/2016/1684792>.

Oxford, Eva M., Hassan Musa, Karen Maass, Wanda Coombs, Steven M. Taffet, and Mario Delmar. 2007. “Connexin43 Remodeling Caused by Inhibition of Plakophilin-2 Expression in Cardiac Cells.” *Circulation Research* 101 (7): 703–11.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.154252>.

Paige, Sharon L., Tomoaki Osugi, Olga K. Afanasiev, Lil Pabon, Hans Reinecke, and Charles E. Murry. 2010. “Endogenous Wnt/ β -Catenin Signaling Is Required for Cardiac Differentiation in Human Embryonic Stem Cells.” Edited by Catherine M. Verfaillie. *PLoS ONE* 5 (6): e11134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011134>.

Peifer, M., S. Berg, and A. B. Reynolds. 1994. “A Repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles.” *Cell* 76 (5): 789–91. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90353-0).

Peifer, M., P. D. McCrea, K. J. Green, E. Wieschaus, and B. M. Gumbiner. 1992. “The Vertebrate Adhesive Junction Proteins Beta-Catenin and Plakoglobin and the Drosophila Segment Polarity Gene Armadillo Form a Multigene Family with Similar Properties.” *The Journal of Cell Biology* 118 (3): 681–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.681>.

- Peng, JianFeng, Devorah Gurantz, Van Tran, Randy T. Cowling, and Barry H. Greenberg. 2002. "Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced AT1 Receptor Upregulation Enhances Angiotensin II-Mediated Cardiac Fibroblast Responses That Favor Fibrosis." *Circulation Research* 91 (12): 1119–26. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000047090.08299.d5>.
- Pesl, Martin, Ivana Acimovic, Jan Pribyl, Renata Hezova, Aleksandra Vilotic, Jeremy Fauconnier, Jan Vrbsky, et al. 2014. "Forced Aggregation and Defined Factors Allow Highly Uniform-Sized Embryoid Bodies and Functional Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells." *Heart and Vessels* 29 (6): 834–46. <https://doi.org/10.1007/s00380-013-0436-9>.
- Pfeiffer, Emily R., Jared R. Tangney, Jeffrey H. Omens, and Andrew D. McCulloch. 2014. "Biomechanics of Cardiac Electromechanical Coupling and Mechanoelectric Feedback." *Journal of Biomechanical Engineering* 136 (2): 021007. <https://doi.org/10.1115/1.4026221>.
- Philippe Chevalier, Adrien Moreau, Sylvain Richard, Alexandre Janin, Gilles Millat, Francis Bessi_ere, and Antoine Delini_ere. 2021. "Short QT Interval as a Harbinger of an Arrhythmogenic Cardiomyopathy," 2021.
- Pieperhoff, Sebastian, Heiderose Schumacher, and Werner W. Franke. 2008. "The Area Composita of Adhering Junctions Connecting Heart Muscle Cells of Vertebrates. V. The Importance of Plakophilin-2 Demonstrated by Small Interference RNA-Mediated Knockdown in Cultured Rat Cardiomyocytes." *European Journal of Cell Biology* 87 (7): 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.12.002>.
- Pilichou, Kalliopi, Carol Ann Remme, Cristina Basso, Maria E. Campian, Stefania Rizzo, Phil Barnett, Brendon P. Scicluna, et al. 2009. "Myocyte Necrosis Underlies Progressive Myocardial Dystrophy in Mouse Dsg2-Related Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (8): 1787–1802. <https://doi.org/10.1084/jem.20090641>.
- Pioner, Josè Manuel, Alice W. Racca, Jordan M. Klaiman, Kai-Chun Yang, Xuan Guan, Lil Pabon, Veronica Muskheili, et al. 2016. "Isolation and Mechanical Measurements of Myofibrils from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Stem Cell Reports* 6 (6): 885–96. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.006>.
- Pokutta, Sabine, and William I. Weis. 2007. "Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 237–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104241>.
- Quarta, Giovanni, Alison Muir, Antonios Pantazis, Petros Syrris, Katja Gehmlich, Pablo Garcia-Pavia, Deirdre Ward, Srijita Sen-Chowdhry, Perry M. Elliott, and William J. McKenna. 2011. "Familial Evaluation in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Impact of Genetics and Revised Task Force Criteria." *Circulation* 123 (23): 2701–9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.976936>.
- Rajamohan, Divya, Elena Matsa, Spandan Kalra, James Crutchley, Asha Patel, Vinoj George, and Chris Denning. 2013. "Current Status of Drug Screening and Disease Modelling in Human Pluripotent Stem Cells." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 35 (3): 281–98. <https://doi.org/10.1002/bies.201200053>.
- Rampazzo, Alessandra, Andrea Nava, Sandro Malacrida, Giorgia Beffagna, Barbara Bauce, Valeria Rossi, Rosanna Zimbello, et al. 2002. "Mutation in Human Desmoplakin Domain

Binding to Plakoglobin Causes a Dominant Form of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *American Journal of Human Genetics* 71 (5): 1200–1206. <https://doi.org/10.1086/344208>.

Remme, Carol Ann, Arthur A. M. Wilde, and Connie R. Bezzina. 2008. “Cardiac Sodium Channel Overlap Syndromes: Different Faces of SCN5A Mutations.” *Trends in Cardiovascular Medicine* 18 (3): 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.01.002>.

Rizzo, Stefania, Elisabeth M. Lodder, Arie O. Verkerk, Rianne Wolswinkel, Leander Beekman, Kalliopi Pilichou, Cristina Basso, Carol Ann Remme, Gaetano Thiene, and Connie R. Bezzina. 2012. “Intercalated Disc Abnormalities, Reduced Na(+) Current Density, and Conduction Slowing in Desmoglein-2 Mutant Mice Prior to Cardiomyopathic Changes.” *Cardiovascular Research* 95 (4): 409–18. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs219>.

Roma-Rodrigues, Catarina, and Alexandra R. Fernandes. 2014. “Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy: Advances and Pitfalls in Molecular Diagnosis and Therapy.” *The Application of Clinical Genetics* 7: 195–208. <https://doi.org/10.2147/TACG.S49126>.

Rook, Martin B., Melvin M. Evers, Marc A. Vos, and Marti F. A. Bierhuizen. 2012. “Biology of Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Expression.” *Cardiovascular Research* 93 (1): 12–23. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr252>.

Rosen, Evan D., Chung-Hsin Hsu, Xinzhong Wang, Shuichi Sakai, Mason W. Freeman, Frank J. Gonzalez, and Bruce M. Spiegelman. 2002a. “C/EBPalpha Induces Adipogenesis through PPARgamma: A Unified Pathway.” *Genes & Development* 16 (1): 22–26. <https://doi.org/10.1101/gad.948702>.

Roux-Buisson, Nathalie, Estelle Gandjbakhch, Erwan Donal, Vincent Probst, Jean-Claude Deharo, Philippe Chevalier, Didier Klug, et al. 2014. “Prevalence and Significance of Rare RYR2 Variants in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Results of a Systematic Screening.” *Heart Rhythm* 11 (11): 1999–2009. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.07.020>.

Ruan, Yanfei, Nian Liu, and Silvia G. Priori. 2009. “Sodium Channel Mutations and Arrhythmias.” *Nature Reviews. Cardiology* 6 (5): 337–48. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.44>.

Saffitz, J. E., L. M. Davis, B. J. Darrow, H. L. Kanter, J. G. Laing, and E. C. Beyer. 1995. “The Molecular Basis of Anisotropy: Role of Gap Junctions.” *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 6 (6): 498–510. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1995.tb00423.x>.

Salvage, Samantha C, Karthik H Chandrasekharan, Kamalan Jeevaratnam, Angela F Dulhunty, Andrew J Thompson, Antony P Jackson, and Christopher L-H Huang. 2018. “Multiple Targets for Flecainide Action: Implications for Cardiac Arrhythmogenesis: Cardiac Actions of Flecainide.” *British Journal of Pharmacology* 175 (8): 1260–78. <https://doi.org/10.1111/bph.13807>.

Sato, Priscila Y., Hassan Musa, Wanda Coombs, Guadalupe Guerrero-Serna, Gustavo A. Patiño, Steven M. Taffet, Lori L. Isom, and Mario Delmar. 2009. “Loss of Plakophilin-2 Expression Leads to Decreased Sodium Current and Slower Conduction Velocity in Cultured Cardiac Myocytes.” *Circulation Research* 105 (6): 523–26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201418>.

Sawant, Abhishek C., Aditya Bhonsale, Anneline S. J. M. te Riele, Crystal Tichnell, Brittney Murray, Stuart D. Russell, Harikrishna Tandri, et al. 2014. "Exercise Has a Disproportionate Role in the Pathogenesis of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy in Patients without Desmosomal Mutations." *Journal of the American Heart Association* 3 (6): e001471. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001471>.

Sayer, Gabriel, and Geetha Bhat. 2014. "The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Heart Failure." *Cardiology Clinics* 32 (1): 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.09.002>.

Schlipp, Angela, Camilla Schinner, Volker Spindler, Franziska Vielmuth, Katja Gehmlich, Petros Syrris, William J. McKenna, Andreas Dendorfer, Eva Hartlieb, and Jens Waschke. 2014. "Desmoglein-2 Interaction Is Crucial for Cardiomyocyte Cohesion and Function." *Cardiovascular Research* 104 (2): 245–57. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu206>.

Schram, Gernot, Marc Pourrier, Peter Melnyk, and Stanley Nattel. 2002. "Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression as a Basis for Regional Specialization in Electrical Function." *Circulation Research* 90 (9): 939–50. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000018627.89528.6f>.

Schupp, Michael, Joshua C. Curtin, Roy J. Kim, Andrew N. Billin, and Mitchell A. Lazar. 2007. "A Widely Used Retinoic Acid Receptor Antagonist Induces Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activity." *Molecular Pharmacology* 71 (5): 1251–57. <https://doi.org/10.1124/mol.106.033662>.

Schupp, Michael, and Mitchell A. Lazar. 2010. "Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40409–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.182451>.

Sen-Chowdhry, Srijita, Robert D. Morgan, John C. Chambers, and William J. McKenna. 2010. "Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Etiology, Diagnosis, and Treatment." *Annual Review of Medicine* 61: 233–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.052208.130419>.

Sepehrkhoy, Shahrzad, Johannes M. I. H. Gho, René van Es, Magdalena Harakalova, Nicolaas de Jonge, Dennis Dooijes, Jasper J. van der Smagt, et al. 2017. "Distinct Fibrosis Pattern in Desmosomal and Phospholamban Mutation Carriers in Hereditary Cardiomyopathies." *Heart Rhythm* 14 (7): 1024–32. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.03.034>.

Shi, Yanhong, Haruhisa Inoue, Joseph C. Wu, and Shinya Yamanaka. 2017. "Induced Pluripotent Stem Cell Technology: A Decade of Progress." *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (2): 115–30. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>.

Shugg, Tyler, John C. Somberg, Janos Molnar, and Brian R. Overholser. 2020. "Inhibition of Human Ether-A-Go-Go-Related Gene (HERG) Potassium Current by the Novel Sotalol Analogue, Soestalol." *JACC. Clinical Electrophysiology* 6 (7): 756–59. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2020.05.037>.

Simpson, M. A., S. Mansour, D. Ahnood, K. Kalidas, M. A. Patton, W. J. McKenna, E. R. Behr, and A. H. Crosby. 2009. "Homozygous Mutation of Desmocollin-2 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Mild Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair." *Cardiology* 113 (1): 28–34. <https://doi.org/10.1159/000165696>.

Sleiman, Yvonne, Monia Souidi, Ritu Kumar, Ellen Yang, Fabrice Jaffré, Ting Zhou, Albin

- Bernardin, et al. 2020. "Modeling Polymorphic Ventricular Tachycardia at Rest Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *EBioMedicine* 60 (October): 103024. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103024>.
- Sommariva, E., S. Brambilla, C. Carbucicchio, E. Gambini, V. Meraviglia, A. Dello Russo, F. M. Farina, et al. 2016. "Cardiac Mesenchymal Stromal Cells Are a Source of Adipocytes in Arrhythmogenic Cardiomyopathy." *European Heart Journal* 37 (23): 1835–46. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv579>.
- Sommariva, Elena, Ilaria Stadiotti, Gianluca L. Perrucci, Claudio Tondo, and Giulio Pompilio. 2017. "Cell Models of Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Advances and Opportunities." *Disease Models & Mechanisms* 10 (7): 823–35. <https://doi.org/10.1242/dmm.029363>.
- Sparks, Matthew A., Steven D. Crowley, Susan B. Gurley, Maria Mirotso, and Thomas M. Coffman. 2014. "Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology." *Comprehensive Physiology* 4 (3): 1201–28. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130040>.
- Sporn, M. B., and A. B. Roberts. 1992. "Transforming Growth Factor-Beta: Recent Progress and New Challenges." *The Journal of Cell Biology* 119 (5): 1017–21. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.5.1017>.
- Stadiotti, Ilaria, Valentina Catto, Michela Casella, Claudio Tondo, Giulio Pompilio, and Elena Sommariva. 2017. "Arrhythmogenic Cardiomyopathy: The Guilty Party in Adipogenesis." *Journal of Cardiovascular Translational Research* 10 (5–6): 446–54. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9767-8>.
- Stanley, William C., Fabio A. Recchia, and Gary D. Lopaschuk. 2005. "Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart." *Physiological Reviews* 85 (3): 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>.
- Stappenbeck, T. S., J. A. Lamb, C. M. Corcoran, and K. J. Green. 1994. "Phosphorylation of the Desmoplakin COOH Terminus Negatively Regulates Its Interaction with Keratin Intermediate Filament Networks." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (47): 29351–54.
- Sun, Ning, Masayuki Yazawa, Jianwei Liu, Leng Han, Veronica Sanchez-Freire, Oscar J. Abilez, Enrique G. Navarrete, et al. 2012. "Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy." *Science Translational Medicine* 4 (130): 130ra47. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003552>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell* 131 (5): 861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Takamaru, Ken-Ichi, Shinji Yamaguchi, Young Sik Lee, Yang Zhang, Richard W. Carthew, and Randall T. Moon. 2003. "Chibby, a Nuclear Beta-Catenin-Associated Antagonist of the Wnt/Wingless Pathway." *Nature* 422 (6934): 905–9. <https://doi.org/10.1038/nature01570>.

Taylor, Matthew, Sharon Graw, Gianfranco Sinagra, Carl Barnes, Dobromir Slavov, Francesca Brun, Bruno Pinamonti, et al. 2011. "Genetic Variation in Titin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy-Overlap Syndromes." *Circulation* 124 (8): 876–85. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005405>.

Te Riele, Anneline S. J. M., Esperanza Agullo-Pascual, Cynthia A. James, Alejandra Leo-Macias, Marina Cerrone, Mingliang Zhang, Xianming Lin, et al. 2017. "Multilevel Analyses of SCN5A Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Suggest Non-Canonical Mechanisms for Disease Pathogenesis." *Cardiovascular Research* 113 (1): 102–11. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw234>.

Te Riele, Anneline S. J. M., Cynthia A. James, Abhishek C. Sawant, Aditya Bhonsale, Judith A. Groeneweg, Thomas P. Mast, Brittney Murray, et al. 2015. "Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy in the Pediatric Population: Clinical Characterization and Comparison With Adult-Onset Disease." *JACC. Clinical Electrophysiology* 1 (6): 551–60. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2015.08.004>.

Tedford, Ryan J., Cynthia James, Daniel P. Judge, Crystal Tichnell, Brittney Murray, Aditya Bhonsale, Binu Philips, et al. 2012. "Cardiac Transplantation in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 59 (3): 289–90. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.051>.

Ten Tusscher, Kirsten H.W.J., and Alexander V. Panfilov. 2007. "Influence of Diffuse Fibrosis on Wave Propagation in Human Ventricular Tissue." *EP Europace* 9 (suppl_6): vi38–45. <https://doi.org/10.1093/europace/eum206>.

Ter Keurs, Henk E. D. J., and Penelope A. Boyden. 2007. "Calcium and Arrhythmogenesis." *Physiological Reviews* 87 (2): 457–506. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2006>.

Thiene, G., A. Nava, D. Corrado, L. Rossi, and N. Pennelli. 1988. "Right Ventricular Cardiomyopathy and Sudden Death in Young People." *The New England Journal of Medicine* 318 (3): 129–33. <https://doi.org/10.1056/NEJM198801213180301>.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1145–47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.

Tiso, N., D. A. Stephan, A. Nava, A. Bagattin, J. M. Devaney, F. Stanchi, G. Larderet, et al. 2001. "Identification of Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene in Families Affected with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 2 (ARVD2)." *Human Molecular Genetics* 10 (3): 189–94. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.189>.

Tontonoz, Peter, and Bruce M. Spiegelman. 2008. "Fat and beyond: The Diverse Biology of PPARgamma." *Annual Review of Biochemistry* 77: 289–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829>.

Topol, Lilia, Xueyuan Jiang, Hosoon Choi, Lisa Garrett-Beal, Peter J. Carolan, and Yingzi Yang. 2003. "Wnt-5a Inhibits the Canonical Wnt Pathway by Promoting GSK-3-Independent Beta-Catenin Degradation." *The Journal of Cell Biology* 162 (5): 899–908. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303158>.

Tse, Gary. 2016. "Mechanisms of Cardiac Arrhythmias." *Journal of Arrhythmia* 32 (2): 75–

81. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.11.003>.

Uzumcu, A. 2005. "Loss of Desmoplakin Isoform I Causes Early Onset Cardiomyopathy and Heart Failure in a Naxos-like Syndrome." *Journal of Medical Genetics* 43 (2): e05–e05. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032904>.

Valente, M., F. Calabrese, G. Thiene, A. Angelini, C. Basso, A. Nava, and L. Rossi. 1998. "In Vivo Evidence of Apoptosis in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *The American Journal of Pathology* 152 (2): 479–84.

Vallée, Alexandre, and Yves Lecarpentier. 2018. "Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/ β -Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis." *Frontiers in Immunology* 9: 745. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00745>.

Vaseghi, Marmar, and Kalyanam Shivkumar. 2008. "The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death." *Progress in Cardiovascular Diseases* 50 (6): 404–19. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.01.003>.

Watanabe, Hiroshi, Nagesh Chopra, Derek Laver, Hyun Seok Hwang, Sean S Davies, Daniel E Roach, Henry J Duff, Dan M Roden, Arthur A M Wilde, and Björn C Knollmann. 2009. "Flecainide Prevents Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Mice and Humans." *Nature Medicine* 15 (4): 380–83. <https://doi.org/10.1038/nm.1942>.

Weber, K. T. 1999. "Aldosterone and Spironolactone in Heart Failure." *The New England Journal of Medicine* 341 (10): 753–55. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411009>.

Weber, K. T., and C. G. Brilla. 1991. "Pathological Hypertrophy and Cardiac Interstitium. Fibrosis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System." *Circulation* 83 (6): 1849–65. <https://doi.org/10.1161/01.cir.83.6.1849>.

Weiss, James N., Zhilin Qu, and Kalyanam Shivkumar. 2017. "Electrophysiology of Hypokalemia and Hyperkalemia." *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 10 (3). <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.004667>.

Wen, Jian-Yan, Chuan-Yu Wei, Khooshbu Shah, Johnson Wong, Cheng Wang, and Huei-Sheng Vincent Chen. 2015. "Maturation-Based Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 79 (7): 1402–8. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0363>.

Weng, Zhihui, Chi-Wing Kong, Lihuan Ren, Ioannis Karakikes, Lin Geng, Jiaozi He, Maggie Zi Ying Chow, et al. 2014. "A Simple, Cost-Effective but Highly Efficient System for Deriving Ventricular Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells and Development* 23 (14): 1704–16. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0509>.

Wichter, T., M. Borggreffe, W. Haverkamp, X. Chen, and G. Breithardt. 1992. "Efficacy of Antiarrhythmic Drugs in Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Disease. Results in Patients with Inducible and Noninducible Ventricular Tachycardia." *Circulation* 86 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1161/01.cir.86.1.29>.

Witcher, L. L., R. Collins, S. Puttagunta, S. E. Mechanic, M. Munson, B. Gumbiner, and P. Cowin. 1996. "Desmosomal Cadherin Binding Domains of Plakoglobin." *The Journal of*

Biological Chemistry 271 (18): 10904–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10904>.

Wu, Liyuan, Zhuqing Jia, Lihui Yan, Weiping Wang, Jiaji Wang, Yongzhen Zhang, and Chunyan Zhou. 2013. “Angiotensin II Promotes Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells via Angiotensin Type 1 Receptor.” *Differentiation; Research in Biological Diversity* 86 (1–2): 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.06.007>.

Wuriyanghai, Yimin, Takeru Makiyama, Kenichi Sasaki, Tsukasa Kamakura, Yuta Yamamoto, Mamoru Hayano, Takeshi Harita, et al. 2018. “Complex Aberrant Splicing in the Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes from a Patient with Long QT Syndrome Carrying KCNQ1-A344Asp Mutation.” *Heart Rhythm* 15 (10): 1566–74. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.05.028>.

Yamanaka, Shinya. 2012. “Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future.” *Cell Stem Cell* 10 (6): 678–84. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>.

Yang, Xiulan, Marita Rodriguez, Lil Pabon, Karin A. Fischer, Hans Reinecke, Michael Regnier, Nathan J. Sniadecki, Hannele Ruohola-Baker, and Charles E. Murry. 2014. “Tri-Iodo-L-Thyronine Promotes the Maturation of Human Cardiomyocytes-Derived from Induced Pluripotent Stem Cells.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 72 (July): 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.005>.

Yang, Zhao, Neil E. Bowles, Steven E. Scherer, Michael D. Taylor, Debra L. Kearney, Shuping Ge, Vyacheslav V. Nadvoretzkiy, et al. 2006. “Desmosomal Dysfunction Due to Mutations in Desmoplakin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy.” *Circulation Research* 99 (6): 646–55. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000241482.19382.c6>.

Yu, Fa-Xing, Bin Zhao, and Kun-Liang Guan. 2015. “Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer.” *Cell* 163 (4): 811–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>.

Yu, Li, Mindy C. Hébert, and Ying E. Zhang. 2002. “TGF-Beta Receptor-Activated P38 MAP Kinase Mediates Smad-Independent TGF-Beta Responses.” *The EMBO Journal* 21 (14): 3749–59. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf366>.

Zhang, Jianhua, Matthew Klos, Gisela F. Wilson, Amanda M. Herman, Xiaojun Lian, Kunil K. Raval, Matthew R. Barron, et al. 2012. “Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: The Matrix Sandwich Method.” *Circulation Research* 111 (9): 1125–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.273144>.

Zhang, Jianhua, Gisela F. Wilson, Andrew G. Soerens, Chad H. Koonce, Junying Yu, Sean P. Palecek, James A. Thomson, and Timothy J. Kamp. 2009. “Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Circulation Research* 104 (4): e30–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192237>.

Zhang, Mingchang, Fabio Tavora, Joao Bosco Oliveira, Ling Li, Marcello Franco, David Fowler, Ziqin Zhao, and Allen Burke. 2012. “PKP2 Mutations in Sudden Death from Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC) and Sudden Unexpected Death with Negative Autopsy (SUDNA).” *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 76 (1): 189–94. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-0747>.

Zhao, Zhihan, Huan Lan, Ibrahim El-Battrawy, Xin Li, Fanis Buljubasic, Katherine Sattler,

Gökhan Yücel, et al. 2018. “Ion Channel Expression and Characterization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.” *Stem Cells International* 2018: 6067096. <https://doi.org/10.1155/2018/6067096>.

Zhou, Y. T., P. Grayburn, A. Karim, M. Shimabukuro, M. Higa, D. Baetens, L. Orci, and R. H. Unger. 2000. “Lipotoxic Heart Disease in Obese Rats: Implications for Human Obesity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4): 1784–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1784>.

Zimmermann, W.-H., K. Schneiderbanger, P. Schubert, M. Didié, F. Münzel, J. F. Heubach, S. Kostin, W. L. Neuhuber, and T. Eschenhagen. 2002. “Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct.” *Circulation Research* 90 (2): 223–30. <https://doi.org/10.1161/hh0202.103644>.

Zwaag, Paul A. van der, Ingrid A. W. van Rijsingen, Angeliki Asimaki, Jan D. H. Jongbloed, Dirk J. van Veldhuisen, Ans C. P. Wiesfeld, Moniek G. P. J. Cox, et al. 2012. “Phospholamban R14del Mutation in Patients Diagnosed with Dilated Cardiomyopathy or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Evidence Supporting the Concept of Arrhythmogenic Cardiomyopathy.” *European Journal of Heart Failure* 14 (11): 1199–1207. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs119>.

H. Annexes

The PPAR γ pathway determines electrophysiological remodeling and arrhythmia risks in DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy

Jean-Baptiste Reisqs, PhD^{1,2,†}, Adrien Moreau, PhD^{3,†}, Azzouz Charrabi³, Yvonne Sleiman, PhD³, Albano C. Meli, PhD³, Gilles Millat, PhD^{1,4,5}, Veronique Briand, PhD², Philippe Beauverger, PhD², Sylvain Richard, PhD^{3,‡,*}, Philippe Chevalier MD^{1,4,‡,*}

1 Neuromyogene Institute, Claude Bernard University, Lyon 1 - Villeurbanne, France

2 Cardiovascular and Metabolism Research, Sanofi R&D – Chilly Mazarin, France

3 Université de Montpellier, INSERM, CNRS, PhyMedExp - Montpellier, France

4 Service de Rythmologie, Hospices Civils de Lyon - Lyon, France

5 Laboratoire de Cardiogénétique moléculaire, Centre de biologie et pathologie Est, Bron, France

†, ‡: These authors contributed equally as junior and senior investigators, respectively.

*: Corresponding authors:

Sylvain Richard
INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier
PhyMedExp
CHU Arnaud de Villeneuve, Bâtiment Crastes de Paulet
371 Avenue du doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier Cedex 5, France.
Email: sylvain.richard@inserm.fr

Or

Philippe Chevalier
Service de rythmologie cardiaque · CHU de *Lyon* HCL –
GH Est-Hôpital Louis Pradel 59 Boulevard Pinel ·
69677 BRON Cedex · France
Email: philippe.chevalier@chu-lyon.fr

Short title: PPAR γ in electrical cardiac remodeling.

Abstract

Background: Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) primarily involves right ventricle impairment and lethal arrhythmias. Histopathological hallmark includes fibrofatty replacement of myocardial tissue, consisting of transdifferentiation of cardiomyocytes into adipocyte cells. Electro-mechanical troubles in cardiomyocytes are also features of ACM and contribute to developing sudden cardiac death. We investigated if the PPAR γ signaling pathway has a central role in electro-mechanical troubles.

Methods: Control and DSC2 patient-specific pluripotent stem cells were reprogrammed and differentiated into cardiomyocytes (hiPSC-CM) to examine gene expression, electro-mechanical properties, and Ca²⁺ handling. We incubated hiPSC-CM DSC2 with 1 μ M PPAR γ inhibitor T0070907 (T007) for 40 days.

Results: Compared to control, DSC2 hiPSC-CM exhibited, by RT-qPCR, a more robust expression of the PPAR γ gene and two pro-adipogenic genes (adiponectin and perilipin). The DSC2 hiPSC-CM incubated with T0070907 demonstrated gene-level close to control. To go further, we determined that contractile properties and action potential duration of DSC2 hiPSC-CM treated with T0070907 were similar to control. Standard AP was associated with a normalization of sodium and potassium currents density, confirmed by RT-qPCR. Moreover, altered Ca²⁺ handling was also corrected, notably increased sparks Ca²⁺ frequency.

Conclusion: Our data suggest that PPAR γ is a central pathway in cardiomyocyte's morphological and electrical remodeling in ACM. We demonstrate that early and long-term inhibition of PPAR γ is necessary to prevent its nefast role in triggering arrhythmia in ACM.

Keywords: PPAR γ ; transdifferentiation; hiPSC-CM; electro-mechanical remodeling; Ca²⁺ handling.

Introduction

Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) is a rare genetic disease characterized by morphological changes in the heart and a high risk of ventricular arrhythmias.(Cristina Basso et al. 2009) The main feature of ACM is a replacement of cardiomyocytes by fibro-fatty tissue.(Corrado, Basso, and Thiene 2009) Half of ACM patients carry a mutation in the genes encoding desmosomal proteins, including plakophilin-2 (PKP2, the most affected gene), desmoplakin, desmoglein-2, plakoglobin, and desmocollin-2.(Cristina Basso et al. 2009; 2012) Desmosomal proteins form a macromolecular complex at the intercalated disc level and are responsible for intercellular adhesion. Furthermore, desmosomes contribute to anchor and maintain the sodium (Na^+) channel and connexins at the membrane level, favoring rapid initiation of cellular depolarization and fast action potential (AP) propagation.(Delmar and McKenna 2010; Rizzo et al. 2012) This macromolecular complex is disturbed by mutations in desmosomal genes, leading to electrophysiological and morphological changes.(Asimaki et al. 2016)

Mutations in desmosomal genes lead to a drastic loss of connexin43 and a reduction in the density of the Na^+ current.(Cerrone and Delmar 2014; Oxford et al. 2007) These mutations may also cause multiple ion channel dysfunctions, abnormal action potential characteristics, and greater sensitivity to adrenergic stimulation.(El-Battrawy et al. 2018) A desmosomal mutation mimicking ACM pathogenesis demonstrated profound electrophysiological remodeling, which may contribute to the occurrence of ventricular arrhythmias.(Cerrone et al. 2012; El-Battrawy et al. 2018; Moreau et al. 2021) Destabilization of desmosomes by mutations may also induce disturbances of intracellular pathways, such as the Wnt/B-catenin pathway activity leading to a change in cell phenotype with lipids accumulation.(S. N. Chen et al. 2014) Destabilization of desmosomal complex promotes the ability of plakoglobin to be translocated into the nucleus and competes with β -catenin, reducing Wnt/B-catenin activity.(Garcia-Gras et al. 2006) This pathway disturbance may promote the morphological changes of cardiomyocytes. Furthermore,

reducing Wnt pathway activity induces overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). (Garcia-Gras et al. 2006b; J. Liu et al. 2006b) An overexpression of PPAR γ was described in human biopsies from ACM patients. (Djouadi et al. 2009; Rosen et al. 2002) The PPAR γ gene is a master regulator of adipocyte differentiation and lipogenesis, explaining why this gene may promote adipogenesis switch in cardiomyocytes in ACM condition. (Cristancho et Lazar 2011; Lefterova et al. 2014) Inhibition of the PPAR γ pathway by antagonist T0070907 (T007) or GW9662 leads to decreased lipid accumulation and apoptosis in human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes. (Wen et al. 2015)

The use of human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) allowed us to reveal that arrhythmias, in ACM condition, is not only due to morphological switch but relies on a profound electrical modification that contributes to trigger rhythm disturbances. Recently, we showed that both electrical activity and Ca²⁺ handling are impaired, leading to contractile dysfunction in hiPSC-CM from an ACM patient with a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene encoding desmocollin 2. (Moreau et al. 2021) This study evidenced that electrical and Ca²⁺ handling changes are an early myogenic signature of ACM in this disease. Therefore, a legitimate question was whether and how PPAR γ over-activation is involved in early changes in the major determinants of the excitation-contraction coupling in hiPSC-CM from patients bearing the *DSC2* (c.394C>T) mutation.

Methods

Cell culture

We described the methods elsewhere. (Moreau et al. 2021) Briefly, we used two control hiPSC lines: one generated by the platform IPS from INMG (hiPSC AG08C5; Neuromyogen institute, Lyon), and the other was obtained from Dr. Xavier Nissan (hiPSC FSC03; I-Stem institute, Evry). The hiPSC were cultured with StemFlex™ in DMEM/F12 medium (ThermoFisher Scientific) and differentiated using the sandwich monolayer technique. We induced cardiac

differentiation by sequentially adding 6 μ M of CHIR99021 (LC Laboratories), 2 μ M of Wnt-C59 (LC Laboratories) at different critical times. Previously, we showed that the DSC2 phenotype is best expressed at 60 days (D60).(Moreau et al. 2021) We incubated cells with T007 or GW1929 for 5 days (i.e., between D55 and D60) or 40 days (i.e., between D20 and D60) during the maturation phase. The T007 was renewed every other day, along with fresh media. In another set of experiments, we cultured cells for 100 days. In the latter experiments, we removed T007 from the culture media between D60 and D100). Finally, for “isolated-cell” experiments, at D53 or D93, cardiomyocytes were dissociated with TrypLE™ Express (ThermoFisher Scientific) and were replated on Matrigel-coated 35 mm petri dishes for patch-clamp and Ca²⁺ measurements.

Quantitative Reverse transcription PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from hiPSC-CM at 60 days using Direct-Zol RNA Miniprep, including DNase treatment following the protocol (Zymo Research, USA, ref: R2051). We performed reverse transcription of 500 ng total RNA into cDNA using the Transcriptor Universal cDNA Master kit (Roche, Basel, Switzerland, ref: 05893151001), following the manufacturer's protocols. We carried out qPCR using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, ref: 04887392001) executed in quintuplicate. We used Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLPO) as internal control, and we normalized the mRNA levels for each sample. Primers for interest genes are listed in table 1.

Table1: Summary of genes evaluated in this study. Target gene, accession numbers, gene description, primer, and product sizes.

Target gene	Accession numbers	Gene description	Primer Sequence (5'-3')	Size (pb)
RPLP0	NM_001002.4	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0	Forward: AGCAAGTGGGAAGGT Reverse: TCATCCAGCAGGTGT	114
PPAR γ	NM_015869.5	Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ	Forward: CGAAGACATTCCATTACAAGAAC Reverse: CTGTCATCTAATTCCAGTGCATTG	120
ADIPOQ	NM_004797.4	Adiponectin	Forward: GAGAAGGGTGAGAAAGGAGAT Reverse: TCATTATCAGCATAGAGTCCATTACG	114
PLIN2	NM_001122.4	Perilipin 2	Forward: GCTTCACTCCCCTGCCTA Reverse: GCATTGCGGAACACTGAGTA	103
MYL2	NM_000432.4	Myosin light chain 2	Forward: CCAGAACAGGGATGGCTT Reverse: TCCTAGTCCTTCTTCTCCG	91
KCNQ1	NM_000218.3	K $_v$ 7.1 (I $_{Ks}$)	Forward: CTCACTCATTAGACCGCA Reverse: TCTTTACCACCACAGACTTCTTG	143
KCNH2	NM_000238.4	K $_v$ 11.1 (I $_{Kr}$)	Forward: GGAGCCTCTGAACCTGTATG Reverse: GACTGAAGCCACCTCTAAC	230
SCN5A	NM_000335.5	Na $_v$ 1.5 (I $_{Na}$)	Forward: GTGAACAACAAGAGCCAGTG Reverse: TGCATACATAATGTCCATCCAGC	127
RYR2	NM_001035.3	Ryanodine Receptor 2	Forward: AATTGAGACGGTCA Reverse: TTGCCAAGAGCGCCC	132

Whole-cell current-clamp recordings

For the current-clamp studies, we recorded the action potential (AP) and global K $^+$, Ca $^{2+}$, and Na $^+$ currents in single cells at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The resistances of patch pipettes ranged between 1 and 2 m Ω . Voltage-clamp command pulses were generated using pCLAMP v10 (Axon Instruments). Currents were filtered at 5kHz, digitized at 10kHz, and stored on a microcomputer equipped with an AD converter (Digidata 1440A, Axon Instruments). The intracellular solution in the patch pipette for AP and potassium recordings contained (in mmol/L): 10NaCl, 122KCl, 1MgCl $_2$, 1EGTA, 10Hepes; and the pH adjusted at 7.3 with KOH. The Bath solution contained (in mmol/L): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl $_2$, 1 MgCl $_2$, 8 Glucose, 10 Hepes; pH at 7.4 with 1N NaOH. For Na $^+$ currents, pipettes were coated with HIPEC (Dow-Corning, Midland, MI, USA) to minimize electrode capacitance. The intracellular solution contained (in mmol/L): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, and 10 HEPES, and the pH was adjusted to 7.4 using 1N CsOH. The bath solution contained (in mmol/L): 105 NMDG, 35 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl $_2$, 1 MgCl $_2$, 10 Glucose, 10 Hepes 10 TEA-Cl, and 0.5 Nimodipine; and the pH was adjusted to 7.4 using methanethiosulfonic acid.

Intracellular Calcium

We loaded the hiPSC-CM with 3 μM of the fluo-4 AM Ca^{2+} indicator (Molecular Probes) for 20 minutes to measure the Ca^{2+} transient. The bath solution contained a physiological solution (in mmol/L): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 8 Glucose, and 10 Hepes; pH adjusted to 7.4 1N NaOH. We recorded the Ca^{2+} transient with a confocal microscope (Zeiss LSM 810) at 63x objective. We obtained the confocal images in the line scan mode (*i.e.*, x-t mode, 1.24ms per line; 512 pixels x 5.000 lines). We normalized the Fluo-4 fluorescent signal (ΔF) relative to basal fluorescence (F_0). Maximal amplitude and event frequencies were extracted and analyzed from raw data by an in-house developed algorithm implemented in Python (version3.0) (<https://asalykin.github.io/PeakInspector/>) and Prism (GraphPad). Sparks events were analyzed using ImageJ plug-in SparkMaster (<https://sites.google.com/site/sparkmasterhome/>).

HiPSC-CM contraction analysis

The hiPSC-CM monolayer contractile function was studied directly in six-well dishes, without dissociation, and placed on the stage of an inverted microscope with a 10X objective and an incubation chamber (37°C, 5% CO_2). Videos were acquired at 30 frames per second. Video analysis was performed using custom-made Matlab scripts. We defined several contractile parameters such as the beat rate, contraction and relaxation time, area under the curve (AUC), summation of contraction and relaxation time, and resting duration. We also studied asynchronous time, which is the time-fraction of each video area spent in asynchrony. Moreover, we calculated the differentiating factor for each analyzed video. This parameter reflects the linear combination of determinant contractile properties ensuring the best discrimination between control and the DSC2 patient-specific hiPSC-CM.

Drugs

We purchased T007 and GW1929 from Tocris. We dissolved the drugs in 100% dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 5 mM and diluted solutions to 1/500 for T007 and 1/1000 for GW1929 in the respective external solutions.

Data analysis and statistics

The electrophysiological results were analyzed using Clampfit (pCLAMP v10.0; Molecular Devices). The Ca^{2+} results were analysed using ImageJ and customized Python programs. We tested Normality (Agostino test) to determine whether data follow a normal distribution. Electrophysiological Normality passed, and the statistical differences were evaluated by two-way ANOVA with Tuckey multiple comparison tests, using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc). We expressed data as means \pm SEM. For Ca^{2+} and contractile function, the normality test failed, indicating a nonnormal distribution. In these cases, we used the Kruskal-Wallis test to evaluate statistical differences. We presented the results using violin plot representation, indicating the median, first and third quartile. Differences were considered significant at $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) or $p < 0,0001$ (****).

Results

Validation of the hiPSC-CM DSC2 patient-specific model

We used a hiPSC-CM model derived from a DSC2 genetic variant found in a patient with ACM to get better insight into ACM pathogenesis. We previously characterized this model mainly by studying the effect of the disease on the electro-mechanical properties of the cells.(Moreau et al. 2021) The contractile activity in DSC2 patient's hiPSC-CM is disturbed compared to control hiPSC-CM. The beat rate is increased by 52%, combined with a 56% increased in asynchronous rate in DSC2 patient's hiPSC-CM (Figure 2). The contraction and relaxation time are decreased by 28% and 24%, respectively. Altogether, these results confirmed the contractile disturbance previously published in DSC2 patient-specific hiPSC-CM.(Moreau et al. 2021) DSC2 patient

cells also demonstrated a 2-fold AP duration shortening (Figure 3), associated with a 3.5 fold increased of K^+ current density (Figure 4 (right panel)). We also observed a 2-fold decrease of Na^+ current density in DSC2 patient hiPSC-CM (Figure 4 (left panel)), confirming the previously published results.(Cerrone et al. 2012; Moreau et al. 2021) Moreover, the Ca^{2+} transient was decreased (Figure 5), consistently with impaired contractility (Figure 2), whereas abnormal spontaneous diastolic microscopic Ca^{2+} events (Ca^{2+} sparks) were promoted (Figure 5). The DSC2 patient hiPSC-CM recapitulated all the properties described previously(Moreau et al. 2021) and were thus challenged with the inhibitor of the $PPAR\gamma$ pathway T007.

T0070907 reduces $PPAR\gamma$ expression and inhibits cellular remodeling in DSC2 patient's hiPSC-CM

$PPAR\gamma$ signaling pathway is a central gene regulator player associated with an adipogenic process in the ACM context. Patient tissue revealed a substantial increase in $PPAR\gamma$ expression (Supplemental data 1). We confirmed higher $PPAR\gamma$ expression in our cellular model where the expression of $PPAR\gamma$ was increased by 122% between control cells and DSC2 hiPSC-CM. To study $PPAR\gamma$ involvement in ACM pathogenesis, we used the T007 $PPAR\gamma$ inhibitor. To validate it, we investigated the effect of chronic long-term exposure (40 days) of 1 μ M T007 on the expression of $PPAR\gamma$ and two target genes of this pathway, namely perilipin and adiponectin, by RT-qPCR. The $PPAR\gamma$ increase in DSC2 patient's hiPSC-CM was prevented by incubating with T007 (-65% vs. hiPSC-CM DSC2 in T007-free conditions) (Figure 1A). We also found an increase in the expression of perilipin (+563%) and adiponectin (+403%) between control cells and DSC2 hiPSC-CM, which was prevented by T007 (Figure1B, C). In addition, we evaluated the expression of the myosin light chain 2 ventricular (MLC2v), a pro-cardiac gene, to confirm the cardiomyocyte phenotype. We found a decrease of MLC2v expression in DSC2 hiPSC-CM, whereas this expression was similar to control levels with the T007 treatment

(Figure 1D). These data demonstrated that T007 incubation inhibits PPAR γ expression and some of its target genes.

T0070907 normalizes the contractile properties in DSC2 hiPSC-CM

We next investigated the effect of PPAR γ inhibition through T007 on cell phenotype and particularly on the excitation-contraction coupling of hiPSC-CM. We studied contraction using a phase-contrast video-based analysis of hiPSC-CM monolayers. Incubation with T007 prevented the degradation of the spontaneous beating rate and other contractile parameters such as the contraction and relaxation duration or the area under the curve (Figure 2A, B, C, D). Furthermore, we observed that the time between two contractions (resting duration) is also similar to control levels in DSC2+T007 hiPSC-CM (Figure 2E). Moreover, the asynchronous rate was decreased by 8% in the T007 condition compared to WT hiPSC-CM (Figure 2F). The differentiating factor is obtained using a generalized linear model and reflects the best discrimination between the control and DSC2 hiPSC-CM. The differentiating factor highly similar to WT hiPSC-CM levels observed with the T007 treatment thus confirmed that inhibiting the PPAR γ pathway prevents the pathogenesis (Figure 2G). To go further and in an attempt to reproduce the pathology, we tested a PPAR γ agonist (GW1929) on control hiPSC-CM. The results showed no difference in contraction properties, characterized by the differentiating factor between control and control+GW1929 (Supplemental data 2A). Overall, these data confirmed that T007 prevents the contractile worsening of DSC2 hiPSC-CM monolayers, but the agonist GW1929 targeting only PPAR γ was not able to disturb contractile properties in control hiPSC-CM.

T0070907 normalizes the action potential duration

The AP initiates the contraction of the cardiac myocytes. We investigated the effect of T007 on the AP using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. We first assessed the impact of T007 following a short chronic incubation of the hiPSC-CM DSC2 for five days to test whether this time is enough to prevent changes in the AP properties. At pacing of 1Hz, there was no difference in the AP duration at 90% repolarization (APD₉₀) between the DSC2 hiPSC-CM group and the DSC2 group treated with T007 (124±9ms DSC2 vs. 130±12ms DSC2+T007-5 days), suggesting no effect of T007 at five days of incubation (Supplemental data 3). Then, we incubated the DSC2 hiPSC-CM with T007 for a much more extended period of 40 days corresponding to long-term chronic exposure. We observed no difference between control and DSC2+T007 APD₉₀ (304±14ms in control vs. 280±11ms in DSC2+T007), indicating that T007 can prevent modifications in the APD₉₀ (Figure 3A, B). The AP dynamicity, reflecting the APD modulation according to pacing frequency, was lost in DSC2 hiPSC-CM. For DSC2+T007 hiPSC-CM, this APD dynamicity is similar to WT hiPSC-CM (Figure 3C). These results demonstrated that T007 prevents the AP modifications due to DSC2 genetic variation over time, as seen after 40 days of culture. We also tested the effect of the PPAR γ agonist GW1929 on the properties of the AP. We found no difference in APD between the control and the control+GW1929 group, confirming the absence of an agonist effect of GW1929 on AP properties (supplemental data 2B).

T0070907 normalizes ionic currents in action potential

We first investigated the Na⁺ current (I_{Na}) responsible for the fast depolarization phase of the AP in voltage-clamp conditions. The decrease of the I_{Na} density and the rightward shift in the voltage-dependence of both activation and steady-state inactivation seen in DSC2 hiPSC-CM were corrected by T007 (Figure 4A). We also analyzed the Na_v1.5 transcript by RT-qPCR and found a decrease in Na_v1.5 expression by 73% in the DSC2 condition compared to control. This

loss of expression was prevented with the T007 incubation (Figure 4B). Therefore, chronic treatment of DSC2 hiPSC-CM with T007 prevented the alterations seen in the DSC2 *vs.* the control group.

Voltage-gated K^+ currents play a crucial role in the repolarization of cardiac AP and mainly determining APD. Chronic treatment of DSC2 patient hiPSC-CM with T007 prevented the alterations seen in this group *vs.* the control group. We observed no difference between the control and the DSC2 patient hiPSC-CM treated with T007 (CTRL: $2,4 \pm 0,4$ pA/pF *vs.* T007: $2,3 \pm 0,22$ pA/pF at 40mV) (Figure 4C). Using RT-qPCR, DSC2 patient hiPSC-CM showed an increase of 227% in the expression of the KCNH2 gene coding for I_{Kr} and 220% in the expression of the KCNQ1 gene coding for I_{Ks} when compared to the control condition (Figure 4D, E). In contrast, DSC2 patient hiPSC-CM incubated with T007 demonstrated expression levels close to control cells (Figure 4D, E). These data confirmed that incubation with the PPAR γ inhibitor T007 prevents the Na^+ and K^+ currents modifications observed between the control hiPSC-CM and the DSC2 patient hiPSC-CM seen after 40 days.

Effect of T0070907 on Calcium handling in hiPSC-CM from DSC2 patients

We evaluated the Ca^{2+} transients of spontaneously beating hiPSC-CM using the non-ratiometric Fluo-4 Ca^{2+} sensitive dye. We observed a decrease of spontaneous Ca^{2+} transient frequency in DSC2+T007 hiPSC-CM (Figure 5A) and an increase in the decay time and Ca^{2+} transient AUC (Figure 5B, C). The AUC indicates the global level of Ca^{2+} mobilized during the Ca^{2+} transient. Finally, the Ca^{2+} sparks, reflecting Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum (SR) through the ryanodine receptor (RYR2), were studied in our model. T007 treatment of DSC2 caused a decrease of aberrant Ca^{2+} events compared to DSC2 cells (Figure 5D, E). Interestingly, the expression level of RYR2 was not changed in our three conditions (fold change 1.1 DSC2 *vs.* 1.2 DSC2+T007) (Figure 5F). PPAR γ inhibitor incubation also affected Ca^{2+} transient

properties. Globally, the T007 restored the Ca^{2+} handling and decreased the aberrant Ca^{2+} leak, potentially triggering arrhythmias in ACM conditions.

Pathologic electrical phenotype develop after T007 discontinuation

We thus assessed the reversibility of the T007 benefits in DSC2 specific hiPSC-CM. We cultured DSC2 hiPSC-CM in the absence or presence of T007 between D20 and D60 and then removed the T007 (if present) for another 40 days (final culture duration: 100 days). At D100, we investigated the cellular AP using the patch-clamp technique for the three groups (CTRL, DSC2 without T007, and DSC2 with T007 only between D20 and D60). Figure 6A, B shows that removing T007 caused a nearly two-fold APD_{90} shortening. In addition, the APD's adaptation to the pacing rate was also lost in line with abnormal AP dynamicity at low stimulation frequencies typical of DSC2 hiPSC-CM (Figure 6C, D). These effects were consistent with the “natural” pathological phenotype characteristics of the mutated DSC2 hiPSC-CM. Therefore, maintaining the regular AP waveform required sustained and continuous exposure to T007 in the culture medium for preventing the AP modifications due to DSC2 genetic variation over time.

Discussion

In this study, we used hiPSC-CM as an *in-vitro* model providing unique access to investigate cardiac cellular functions and signaling pathways not accessible in an ACM patient. The heart and the hiPSC-CM from this patient bearing a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene encoding desmocollin-2 exhibited high abnormal expression, compared to the control group, of the *PPAR γ* gene at 60 days of differentiation. Long-term exposure of DSC2 hiPSC-CM to the *PPAR γ* inhibitor T007 prevented the variant-specific alterations of the excitation-contraction coupling and the occurrence of pro-arrhythmogenic events.

Patient-specific hiPSC-CM are more and more commonly used as a cellular model of ACM to reproduce hallmarks of ACM *in vitro*.(Kim et al. 2013; D. Ma et al. 2013; Wen et al. 2015) In mutant PKP2 iPSC-CMs, features include exaggerated lipogenesis and apoptosis due to overexpression of PPAR γ .(Kim et al. 2013; Lee et al. 2002) Consistently, here we found an abnormally high expression of PPAR γ both in the heart sample and in the hiPSC-CM derived from a patient bearing the *DSC2* (c.394C>T) mutation. The expression of cardiac-specific gene *MLC2v* confirmed the cardiomyocyte phenotype of *DSC2* hiPSC-CM. However, the mutation caused a decrease in its expression, whereas the expression of the two pro adipogenic genes, perilipin, and adiponectin, increased. These results confirmed the cardiomyocyte switch and links with previous studies.(Garcia-Gras et al. 2006; Kim et al. 2013) Strikingly, the PPAR γ inhibitor T007 prevented all changes in the expression of these genes over time in *DSC2* hiPSC-CM, validating our model for functional investigation of the effect of T007 on the *DSC2* hiPSC-CM cellular phenotype. In ACM, the PPAR γ signaling pathway potentially affects morphological switch in cardiomyocytes and can trigger arrhythmia.(Caspi et al. 2013; D. Ma et al. 2013)

One key result of our study was that T007 prevented several defects in excitation-contraction coupling parameters due to the *DSC2* (c.394C>T) mutation, as observed after 60 days of *DSC2* hiPSC-CM differentiation in culture.(Moreau et al. 2021) In comparison with control cells, *DSC2* hiPSC-CM exhibit disturbed contraction, shortened AP duration, determined notably by increased K⁺ current, in addition to decreased Ca²⁺ transients after 60 days of differentiation. Prominently, T007 maintained excitation-contraction coupling of the *DSC2* hiPSC-CM similar to that of control hiPSC-CM. Sustained exposure of hiPSC-CM to PPAR γ inhibitor for 40 days nicely prevented most deleterious electrical defects and participated in normalizing the contractile properties in *DSC2* hiPSC-CM. Late incubation with

T007 for five days, *i.e.*, between 55 and 60 days in culture, was insufficient to reverse the variant-specific modifications in DSC2 hiPSC-CM, supporting the idea of a slow, irreversible, evolutionary process resulting from overactivation of the PPAR γ pathway. Furthermore, continuous long-term exposure to T007 was required to maintain a WT-like cellular electrophysiological signature. Temporary exposure was inefficient for long-term protection. Interestingly, the PPAR γ agonist (GW1929) failed to induce the cellular alterations associated with the *DSC2* (c.394C>T) variant. This finding aligns with a study showing that PPAR γ expression is insufficient to induce adipogenesis in skeletal muscle.(Ban et al. 2008) Therefore, PPAR γ agonism was alone inadequate to reproduce the effect of the variant, whereas early PPAR γ antagonism was enough to counteract this effect. Overall, our results showed that PPAR γ , in parallel with promoting transdifferentiation of the DSC2 hiPSC-CM into adipocytes, profoundly affects the cardiomyocyte's electro-mechanical phenotype during this process. Significant defects in excitation-contraction coupling are already present in relatively immature hiPSC-CM and are likely to set on at an early stage of the disease.

The fibro-fatty replacement is a significant hallmark of ACM, but it is not exclusively the cause of rhythm disturbances. A profound modification of the cell electrical profile is necessary.(El-Battrawy et al. 2018; Moreau et al. 2021) Another key finding of our present study was that T007 prevented contractile asynchrony, suggesting a benefit on potential pro-arrhythmogenic risks. This benefit relied on at least two mechanisms. One source is AP duration. Shortened AP, and short QT syndrome, have been associated with a risk of life-threatening ventricular tachyarrhythmias and sudden cardiac death.(Gaita et al. 2003) Spontaneous Ca²⁺ events during the diastolic period are another origin of ventricular arrhythmias.(Austin et al. 2019) Here, the *DSC2* (c.394C>T, p.R132C) mutation bearing hiPSC-CM exhibited increased Ca²⁺ sparks frequency. The Ca²⁺ sparks originate from leaky Ryanodine Receptor (RYR2) and contribute to ACM arrhythmogenesis.(Roux-Buisson et al.

2014) Here, the Ca^{2+} sparks did not reflect an increase in RYR2 expression and may involve enhanced activity due to a post-translational modification. Overall, our results align with the Ca^{2+} -handling deficits reported in hiPSC-CM bearing a homozygous PKP2 mutation.(Kim et al. 2013) Therefore, T007 maintained standard AP and intracellular Ca^{2+} homeostasis.

The iPSC-CM is an approach that allows working on human model cardiomyocytes. Most cardiac ionic channels are found in hiPSC-CM, representing a force to electrophysiological characterization.(Honda et al. 2011; Zhao et al. 2018) However, these cells have specific limitations despite their many advantages, such as an immature contractile structure.(Lundy et al. 2013) The spontaneous contractility of hiPSC-CM confirms their incomplete maturity.(Karakikes et al. 2015) Since we investigated only one DSC2 mutation, it would be interesting to study other desmosomal mutations, notably PKP2 mutations that are the most frequent in ACM, to assess these results' scope and significance.(M. Zhang et al. 2012)

Conclusion

The present study highlights the early central role of the PPAR γ pathway in developing the ACM disease progression for a patient bearing a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene encoding desmocollin-2. The PPAR γ inhibitor, T007, prevented the switch between cardiac and pro-adipogenic gene expression profiles (MLC2v vs. perilipin and adiponectin). In parallel, T007 contained the defects associated with the remodeling of electro-mechanical phenotype in the DSC2 hiPSC-CM. In addition, the study shows that the PPAR γ -dependent alterations of pathways play a critical role in promoting proarrhythmic risks as soon as the early stage of the disease.

List of abbreviations:

Action potential	AP
Action potential duration	APD
Arrhythmogenic cardiomyopathy	ACM
Desmocollin-2	DSC2
myosin light chain 2 ventricular	Mlc2v
Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocyte	hiPSC-CM
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma	PPAR γ
Plakophilin-2	PKP2
Ryanodine Receptor	RYR
T0070907	T007

Acknowledgments

We thank the “*Montpellier Ressources Imagerie*” (MRI) platform (<https://www.mri.cnrs.fr/fr/>).

Sources of Funding

A CIFRE grant from SANOFI R&D supported this work to JBR. Fond Marion Elisabeth Brancher supported the post-doctoral fellowship of AM.

Disclosures

Sanofi, a global biopharmaceutical company focused on human health, employs JB Reisqs, V Briand, and P Beauverger. All other authors have nothing else to disclose. All authors read and approve the final version of the manuscript and ensure it is the case.

References

1. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373:1289–1300.

2. Corrado D, Basso C, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update. *Heart*. 2009;95:766–773.
3. Basso C, Corrado D, Bauce B, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1233–1246.
4. Delmar M, McKenna WJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res*. 2010;107:700–714.
5. Rizzo S, Lodder EM, Verkerk AO, Wolswinkel R, Beekman L, Pilichou K, Basso C, Remme CA, Thiene G, Bezzina CR. Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovasc Res*. 2012;95:409–418.
6. Asimaki A, Protonotarios A, James CA, Chelko SP, Tichnell C, Murray B, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, te Riele A, Kléber AG, Judge DP, Calkins H, Saffitz JE. Characterizing the Molecular Pathology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Patient Buccal Mucosa Cells. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9:e003688.
7. Cerrone M, Delmar M. Desmosomes and the sodium channel complex: implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;24:184–190.
8. Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res*. 2007;101:703–711.
9. El-Battrawy I, Zhao Z, Lan H, Cyganek L, Tombers C, Li X, Buljubasic F, Lang S, Tiburcy M, Zimmermann W-H, Utikal J, Wieland T, Borggrefe M, Zhou X-B, Akin I. Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace*. 2018;20:f46–f56.
10. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang F-X, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and

arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res.* 2012;95:460–468.

11. Moreau A, Reissq J-B, Delanoe-Ayari H, Pierre M, Janin A, Deliniere A, Bessière F, Meli AC, Charrabi A, Lafont E, Valla C, Bauer D, Morel E, Gache V, Millat G, Nissan X, Faucherre A, Jopling C, Richard S, Mejat A, Chevalier P. Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: From ion channels to ECG and tailored drug therapy. *Clin Transl Med.* 2021;11:e319.

12. Chen SN, Gurha P, Lombardi R, Ruggiero A, Willerson JT, Marian AJ. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2014;114:454–468.

13. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2006;116:2012–2021.

14. Liu J, Wang H, Zuo Y, Farmer SR. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5827–5837.

15. Djouadi F, Lecarpentier Y, Hébert J-L, Charron P, Bastin J, Coirault C. A potential link between peroxisome proliferator-activated receptor signalling and the pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2009;84:83–90.

16. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16:22–26.

17. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:722–734.

18. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:293–302.

19. Wen J-Y, Wei C-Y, Shah K, Wong J, Wang C, Chen H-SV. Maturation-Based Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ J*. 2015;79:1402–1408.
20. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, Marine JE, Calkins H, Kelly DP, Judge DP, Chen H-SV. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494:105–110.
21. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, Oh Y, Tan SH, Ng ML, Shim W, Wong P, Liew R. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2013;34:1122–1133.
22. Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen J-L, Li Y. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem*. 2002;277:19649–19657.
23. Caspi O, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Maizels L, Boulos M, Gepstein L. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:557–568.
24. Ban A, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M. In vivo gene transfer of PPAR gamma is insufficient to induce adipogenesis in skeletal muscle. *J Vet Med Sci*. 2008;70:761–767.
25. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation*. 2003;108:965–970.
26. Austin KM, Trembley MA, Chandler SF, Sanders SP, Saffitz JE, Abrams DJ, Pu WT. Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:519–537.

27. Roux-Buisson N, Gandjbakhch E, Donal E, Probst V, Deharo J-C, Chevalier P, Klug D, Mansencal N, Delacretaz E, Cosnay P, Scanu P, Extramiana F, Keller D, Hidden-Lucet F, Trapani J, Fouret P, Frank R, Fressart V, Fauré J, Lunardi J, Charron P. Prevalence and significance of rare RYR2 variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: results of a systematic screening. *Heart Rhythm*. 2014;11:1999–2009.
28. Honda M, Kiyokawa J, Tabo M, Inoue T. Electrophysiological characterization of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *J Pharmacol Sci*. 2011;117:149–159.
29. Zhao Z, Lan H, El-Battrawy I, Li X, Buljubasic F, Sattler K, Yücel G, Lang S, Tiburcy M, Zimmermann W-H, Cyganek L, Utikal J, Wieland T, Borggrefe M, Zhou X-B, Akin I. Ion Channel Expression and Characterization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Int*. 2018;2018:6067096.
30. Lundy SD, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22:1991–2002.
31. Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res*. 2015;117:80–88.
32. Zhang M, Tavora F, Oliveira JB, Li L, Franco M, Fowler D, Zhao Z, Burke A. PKP2 mutations in sudden death from arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and sudden unexpected death with negative autopsy (SUDNA). *Circ J*. 2012;76:189–194.

Figure Legends:

Figure 1: T0070907 modulates PPAR γ pathway and prevents the cardiomyocyte phenotype in DSC2 patient-specific hiPSC-CM. Fold change compared to control for (A) PPAR γ , (B) Perilipin, (C) Adiponectin, and (D) Myosin Light Chain (MLC) expression level, measured using Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Error bars represent the standard error of the mean (SEM), N=5/group. *: Control vs DSC2, #: DSC2 vs T007 and \$: Control vs T007. ***P<0.001 (Tuckey multiple comparisons test)

Figure 2: T0070907 prevents contractile disturbances in DSC2 patient-specific hiPSC-CM. The contractile activity was studied by video analysis in monolayer condition (control N=249 (black); patient N=212 (red); T0070907 N=197 (blue)): beat rate (A), contraction duration (B), relaxation duration (C), Area under the curve (D), Resting duration (E), asynchronous rate (F) and differentiating factor (G). Results are represented by violin plot with the median, first, and third quartile. *: Control vs DSC2, #: DSC2 vs T007, §: Control vs T007. ***P<0.001 (Kruskal-Wallis test)

Figure 3: Inhibition of PPAR γ pathway contributes to normalizing the action potential duration in DSC2 hiPSC-CM. (A) Raw trace illustrating the AP of control (black), patient-specific hiPSC-CM (Red), and after incubation of 1 μ M T0070907 for 40 days (blue). (B) AP duration at 90% of repolarization (APD₉₀). (C) Adaptation of APD₉₀ at different pacing (0.5, 1.0 and 2.0Hz). Error bars represent the mean standard error (SEM), control n=34, DSC2 n=32 and DSC2+T007 n=39. *: Control vs DSC2, #: DSC2 vs T007. ***P<0.001 (Tuckey multiple comparisons test)

Figure 4: Normalization of ion channel currents provoked by T0070907 in DSC2 patient-specific hiPSC-CM. Left panel represents: (A) whole-cell Na currents traces of control (top), patient-specific hiPSC-CM (middle) and after incubation of T007 (bottom) and current density-voltage (I-V) curves of peak Na currents associated (control n=16, DSC2 n=16 and DSC2+T007 n=19). (B) The expression level of voltage-gated Na⁺ channel alpha subunit (N=4/group). Right panel represents: (C) whole-cell I_K currents traces of control (top), patient-specific (middle) and after incubation of T0070907 (bottom) hiPSC-CM and I-V curves of I_K currents associated (control n=15, DSC2 n=18 and DSC2+T007 n=14). Expression level study by RT-qPCR of potassium voltage-gated channel subfamily H2 (D) and subfamily Q1 (E)

(N=4/group). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). *: Control vs DSC2, #: DSC2 vs T007, §: Control vs T007. ***P<0.001 (Tuckey multiple comparisons test)

Figure 5: Spontaneous Ca^{2+} handlings of control, patient-specific hiPSC-CM and incubated with T0070907. The Ca^{2+} transient activity (control N=207 (black); patient N=222 (red); T0070907 N=197 (blue)) were studied. Spontaneous frequency (A), area under the curve (AUC) (B). The Ca^{2+} sparks were studied by measuring the number of sparks in each cell (C), and the frequency of sparks (D). The violin plot represented the median, first, and third quartile, and a Kruskal-Wallis test was performed. (E) The expression level of Ryanodine Receptor 2 was studied by RT-qPCR (n=4/group and Tuckey multiple comparisons test were performed) *: Control vs. DSC2, #: DSC2 vs. T007, §: Control vs. T007. ***P<0.001

Figure 6: Inhibition of the PPAR γ pathway is reversible. (A) Raw trace illustrating the AP of control (black), patient-specific hiPSC-CM (Red), and after temporary incubation with 1 μM T0070907 for 40 days (D20-D60) and then removal of the drug for the next 40 days (D60-D100) (blue). (B) AP duration at 90% of repolarization (APD_{90}). (C) Adaptation of APD_{90} at different pacing (0.5, 1.0 and 2.0 Hz). (D) Comparison of APD_{90} in control, DSC2, and DSC2+T007 between D60 (blank) and D100 (black square). Error bars represent the mean standard error (SEM), control n=32, DSC2 n=34 and DSC2+T007 n=33. *: Control vs. DSC2, # : DSC2 vs. T007, § : Control vs. T007. + : DSC2+T007 D60 vs. DSC2+T007 D100 ***P<0.001 (Tuckey multiple comparisons test).

Figures

Figure 1

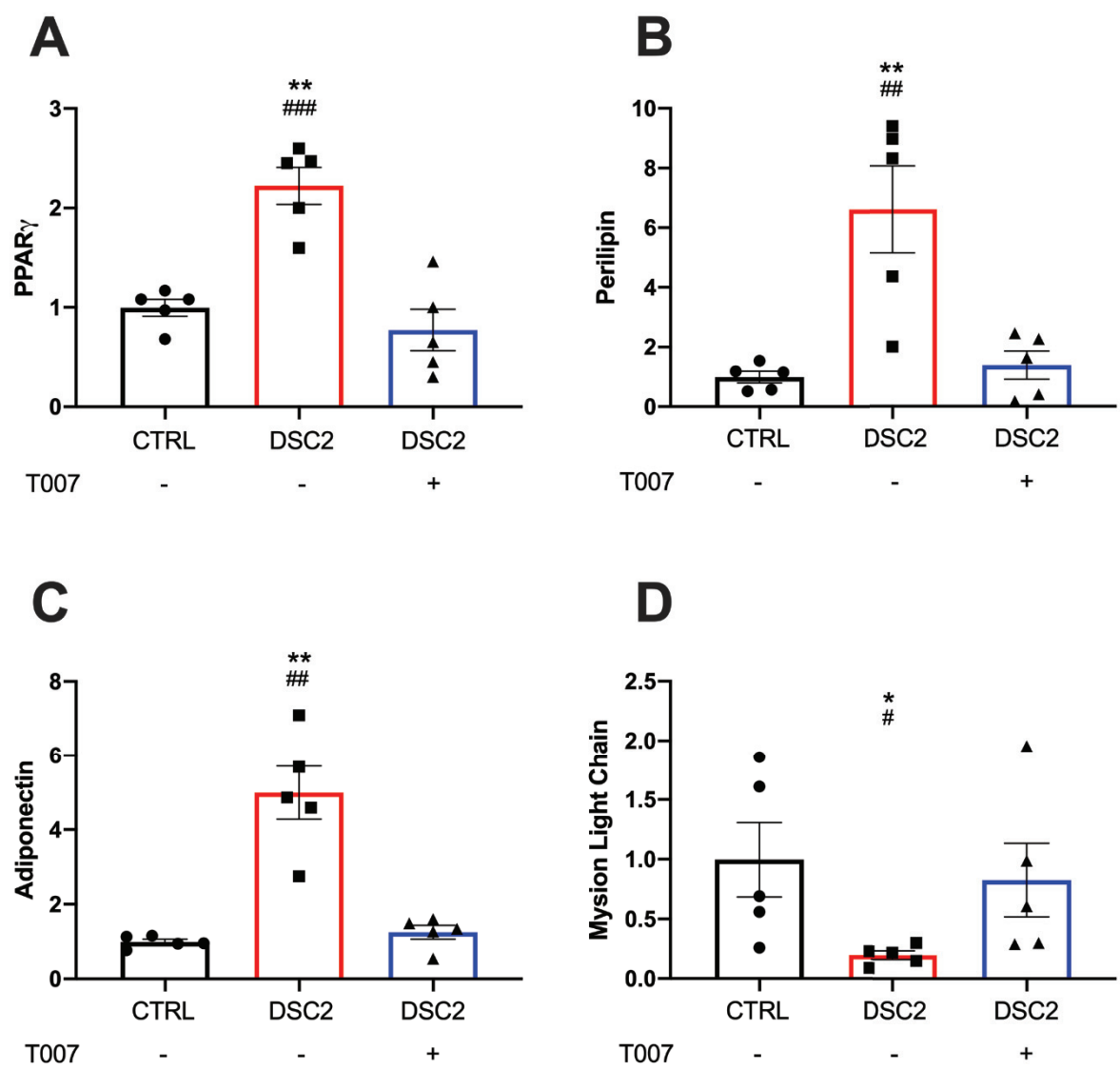


Figure 2

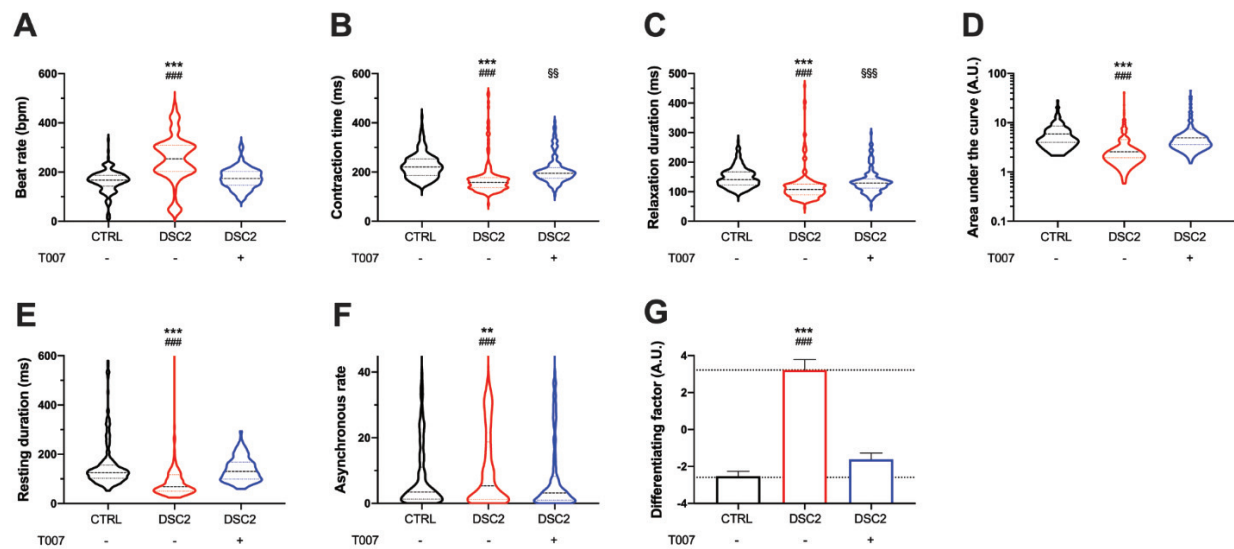


Figure 3

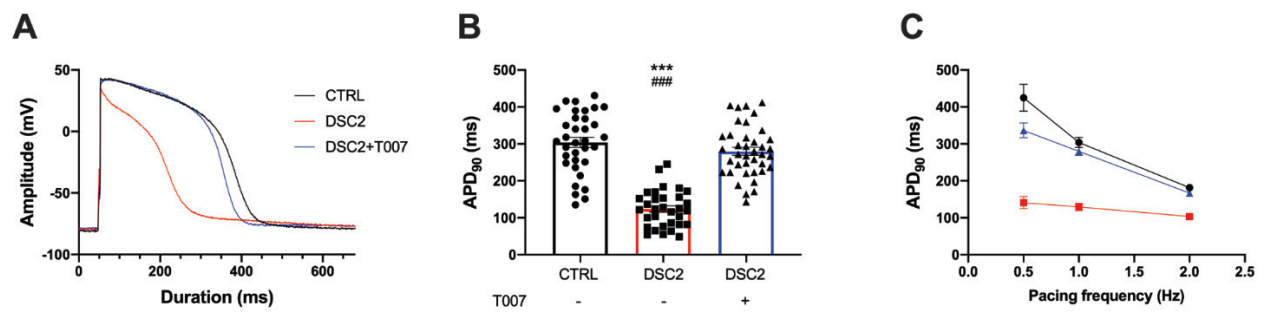


Figure 4

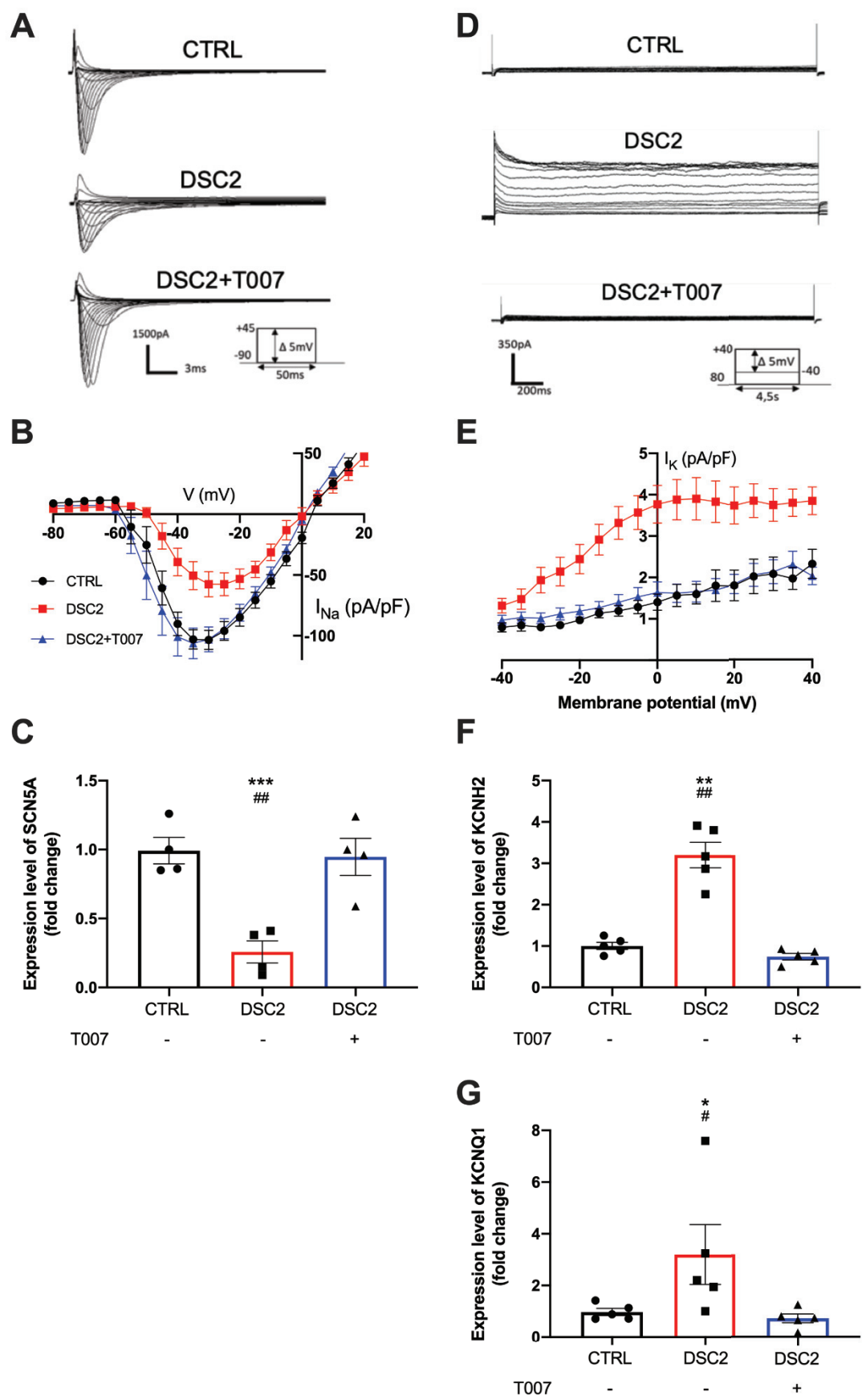


Figure 5

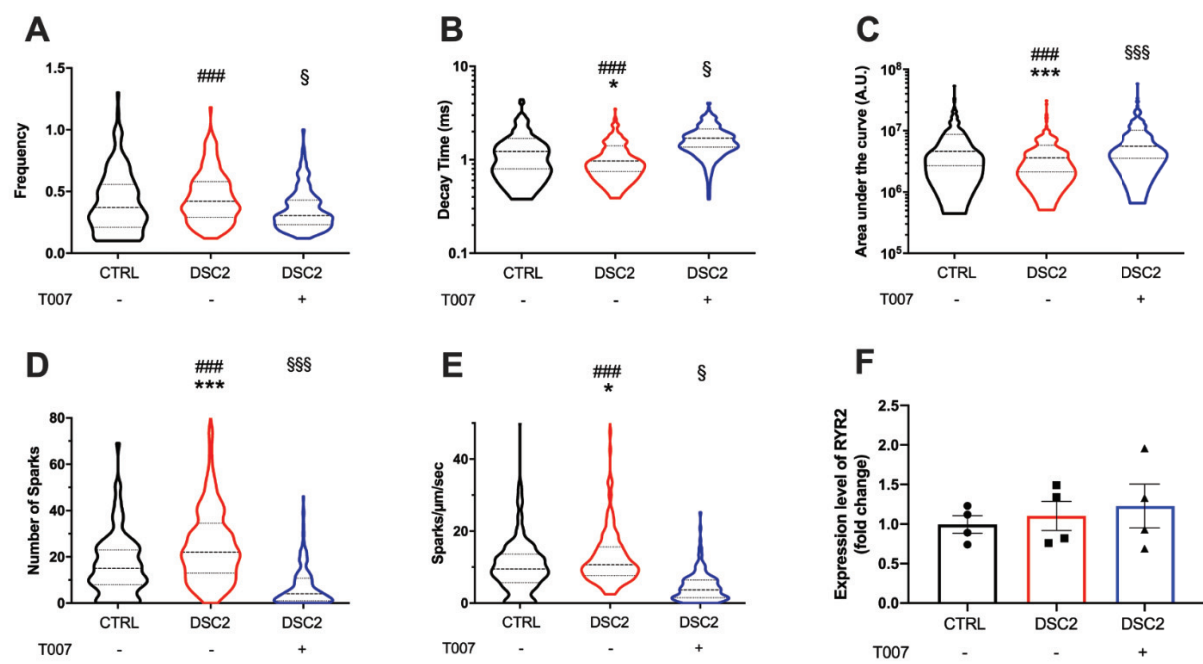
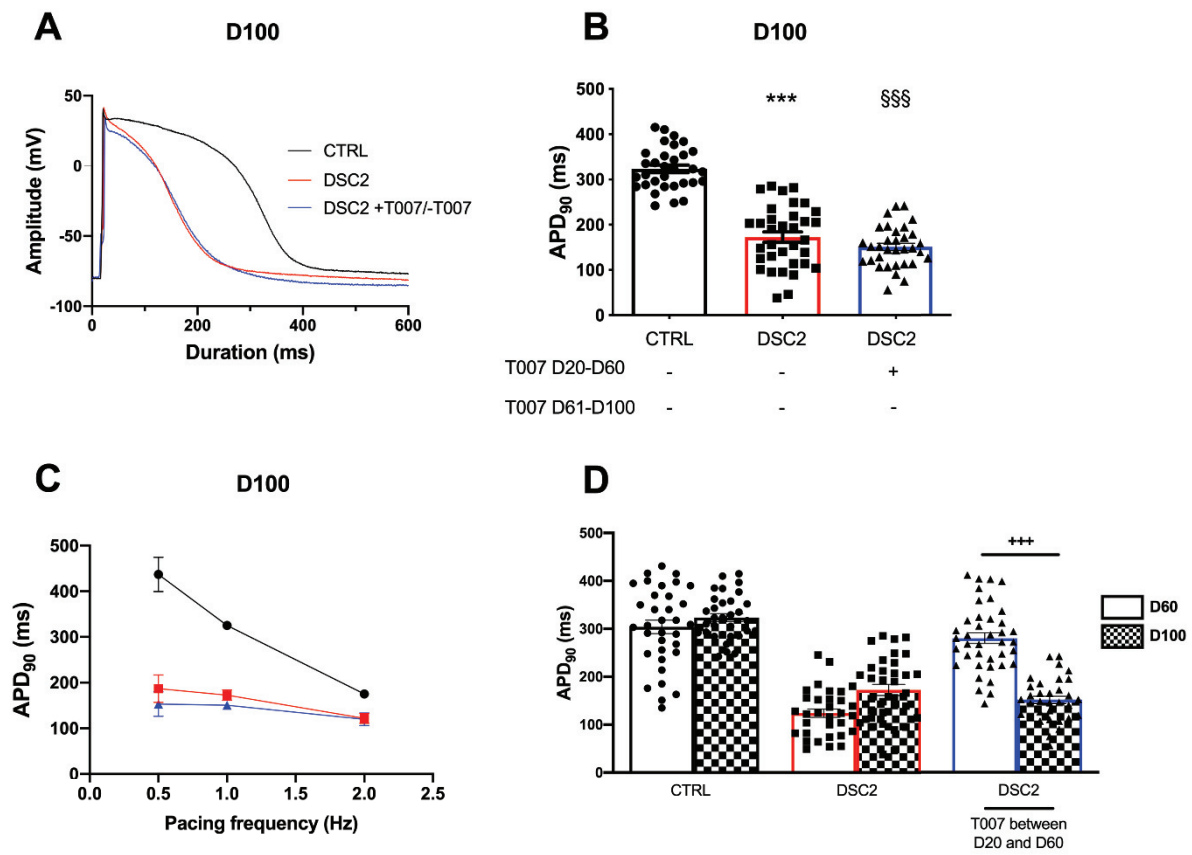


Figure 6



Supplemental Data.

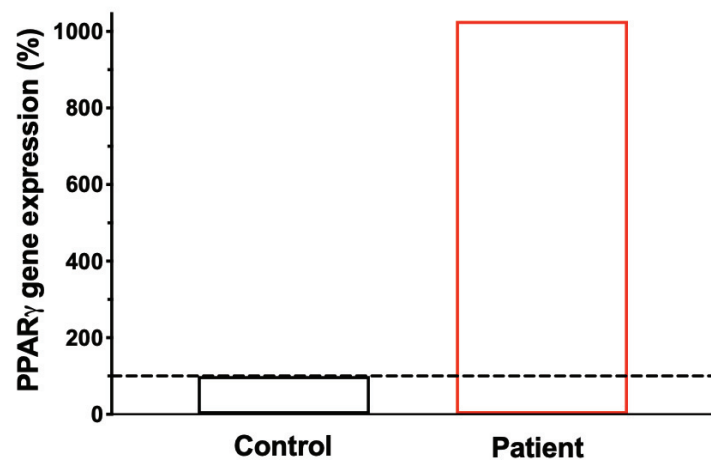
SUPPLEMENTAL figure 1: PPAR γ expression in patient DSC2 heart sample. Relative level of PPAR γ in human heart sample from control and an ACM patient with a missense mutation (c.394C>T) in the *DSC2* gene. Data obtained from transcriptome analysis (Affymetrix, HG-U133_plus2 chips).

SUPPLEMENTAL figure 2: Evaluation of PPAR γ agonist in WT hiPSC-CM. (A) Differentiating factor of contractile property and (B) AP duration at 90% of repolarization (APD₉₀) in WT hiPSC-CM with or without 40 days of 5 μ M GW1929. *: Control vs. DSC2, §: DSC2 vs. GW1929. ***P<0.001 (t-test comparison).

Supplemental figure 3: Electrical activity of control and patient-specific hiPSC-CM with or without PPAR γ for five days. (A) AP duration at 90% of repolarization APD₉₀, (D) Raw trace illustrating the action potential of control (black), patient-specific hiPSC-CM (Red) and after incubation of T0070907 (grey), (E) Adaptation of APD at 0.5, 1, and 2Hz, (F) maximal upstroke velocity. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). *: Control vs. DSC2, #: DSC2 vs. T007 and §: Control vs. T007. ***P<0.001 (Tuckey multiple comparisons test)

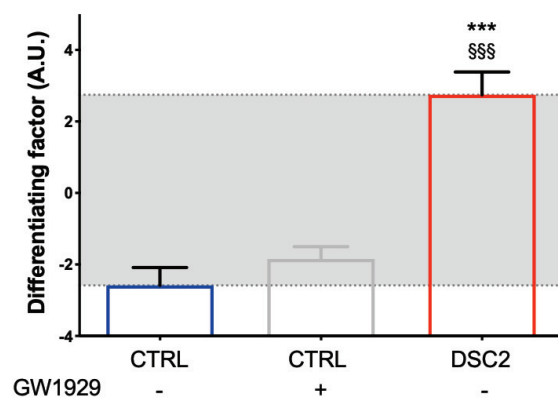
SUPPLEMENTAL figure 4: Evaluation of Na_v biophysical parameters. (A) Voltage-dependence of steady-state activation and inactivation of Na_v channels.

Supplemental data 1

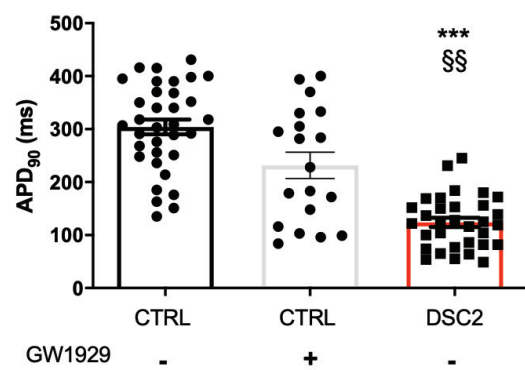


Supplemental data 2

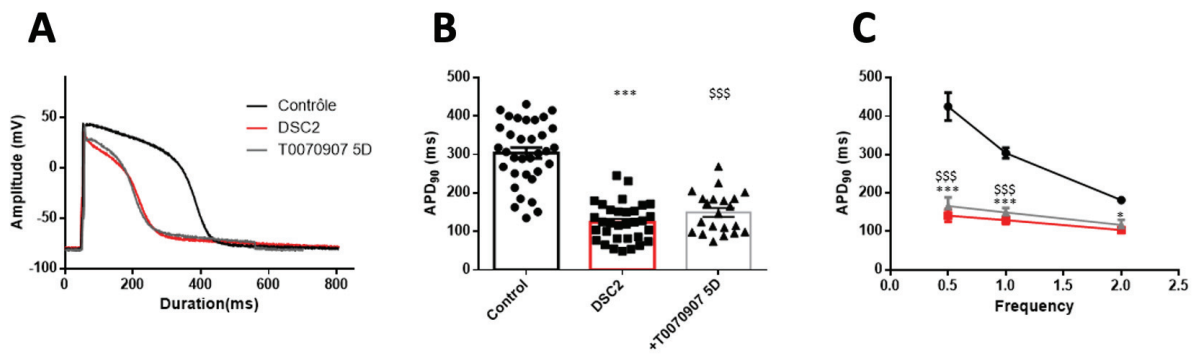
A



B



Supplemental data 3



Supplemental data 4

