

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

\*\*\*\*\*

# Création de pacemakers bio-artificiels cardiaques

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Chimie Biologie

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Physiologie

*présentée*

*et soutenue publiquement par*

**ORE CERPA Cynthia**

*Le 10 novembre 2011, devant le jury ci-dessous*

*Président*

**Mme. Gauthier Chantal**, *Professeur, Université de Nantes, Inserm UMR915, Nantes*

*Rapporteurs*

**M. Bois Patrick**, *Professeur, Université de Poitiers, CNRS UMR6187*

**Mme. Miquerol Lucile**, *Directeur de recherche, IBDML - CNRS UMR6216, Marseille*

*Examineur*

**M. Fromes Yves**, *Directeur de recherche, Institut de Myologie, UMRS 974, Paris*

*Directeur de thèse*

**M. Charpentier Flavien**, *Directeur de recherche, Inserm UMR915, Nantes*

**TABLE DES MATIERES**

**INDEX DES ILLUSTRATIONS ..... 5**

**LISTE DES ABREVIATIONS ..... 7**

**AVANT-PROPOS ..... 10**

**INTRODUCTION ..... 11**

**A. GENESE DE L’AUTOMATISME CARDIAQUE ..... 11**

    I. Automatisme Cardiaque ..... 11

        1. Déterminants moléculaires régulant la formation du nœud sinusal ..... 11

        2. Le nœud sinusal..... 15

        3. Automatisme dans le nœud sinusal ..... 17

        4. Automatisme dans le nœud auriculo-ventriculaire..... 20

        5. Automatisme dans les fibres de Purkinje ..... 21

    II. Les mécanismes ioniques générant l’automatisme ..... 22

        1. Le courant « pacemaker » If..... 24

            1.1 Les différents gènes HCN et leurs rôles dans l’automatisme..... 28

            1.2 Autres voies de régulation des canaux HCN..... 31

        2. Les courants calciques..... 33

            2.1 Les canaux calciques ..... 33

            2.2 Le calcium intracellulaire ..... 34

        3. Les courants sodiques..... 37

        4. Les courants potassiques ..... 39

5. Les courants chlorures.....	42
<b>B. LES PATHOLOGIES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE.....</b>	<b>43</b>
I. Les dysfonctions sinusales .....	43
II. Les troubles de la conduction.....	45
<b>C. LE PACEMAKER BIO-ARTIFICIEL.....</b>	<b>48</b>
I. L’approche cellulaire.....	49
II. L’approche génique.....	54
III. Une Nouvelle approche : la reprogrammation cellulaire .....	62
<b>RESULTATS .....</b>	<b>64</b>
<b>PROJET 1 : DEVELOPPEMENT D’UN PACEMAKER BIO-ARTIFICIEL PAR TRANSFERT NON-VIRAL D’UNE PROTEINE DE FUSION HCN1-HCN2 DANS UN MODELE DE SOURIS EN BLOC AURICULO-VENTRICULAIRE COMPLET. ....</b>	<b>64</b>
I. Introduction .....	64
II. Matériels et Méthodes .....	66
III. Résultats .....	73
IV. Discussion .....	79
<b>PROJET 2 : ETUDE DE LA FAISABILITE D’UTILISER LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION TBX3 POUR GENERER UNE ACTIVITE PACEMAKER <i>IN</i> <i>VITRO</i>.....</b>	<b>85</b>
I. Introduction .....	85
II. Matériels et Méthodes .....	86
III. Résultats .....	98
IV. Discussion .....	108

**DISCUSSION GENERALE ..... 114**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 119**

## INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Reconstruction tridimensionnelle du cœur embryonnaire de souris à E14.5. ....	13
Figure 2 : Morphologie des cellules du nœud sinusal et des cellules atriales. ....	16
Figure 3 : Potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal. ....	18
Figure 4 : Cartographie des différents potentiels d'action lors de la propagation de l'excitation dans le nœud sinusal du lapin. ....	19
Figure 5 : Schéma illustrant les propriétés électrophysiologiques des cellules pacemakers indiquant la contribution des différents canaux ioniques à la genèse des potentiels d'action .	23
Figure 6 : Représentation schématique de la sous-unité $\alpha$ et de la structure tétramérique du canal HCN. ....	25
Figure 7 : Effets des agonistes sur l'activité pacemaker et sur le courant $I_f$ des cellules du nœud sinusal de lapin. ....	26
Figure 8 : Régulation $\beta$ -adrénergique des canaux HCN. ....	27
Figure 9 : Propriétés cinétiques des différents isoformes des canaux HCN. ....	29
Figure 10 : Contrôle de l'automatisme des cellules du nœud sinusal par le cycle calcique spontané. ....	36
Figure 11 : Classification clinique des troubles de la conduction auriculo ventriculaire. ....	47
Figure 12 : Schéma illustrant l'approche cellulaire pour délivrer les canaux pacemaker HCN. ....	51
Figure 13 : Structure générale des poloxamines. ....	61
Figure 14 : Introduction de la sonde dans la veine jugulaire droite. ....	69
Figure 15 : Méthode de mesure des valeurs sur l'ECG de surface D1. ....	72
Figure 17 : Constante d'activation des canaux HCN1-HCN2. ....	74
Figure 18 : Suivi à long terme des rythmes d'échappement ventriculaires. ....	76

Figure 19 : Caractérisation des complexes QRS 15 jours après ablation du faisceau de His. .	77
Figure 20 : Effet de l'isoprénaline (40 µg/kg) sur le rythme d'échappement ventriculaire après ablation du faisceau de His.....	78
Figure 21 : Schéma illustrant le système XCELLigence et le principe de mesure du cell index. .....	95
Figure 22 : Les composantes du système RTCA cardio. ....	96
Figure 23 : Surexpression de Tbx3 dans les cardiomyocytes 24 H et 48 H après infection. ...	98
Figure 24 : Expression du facteur de transcription Tbx3 dans des cardiomyocytes néonataux de souris 48 H après infection. ....	99
Figure 25 : Remodelage du niveau d'expression des transcrits des canaux ioniques. ....	101
Figure 26 : Conséquences induites par la surexpression de Tbx3 sur l'expression protéique de Nav1.5 et HCN4.....	102
Figure 27 : Remodelage de l'expression des ARNm codant pour les connexines cardiaques. .....	103
Figure 28 : Expression de la connexine 43 dans les cardiomyocytes néonataux 48 h après infection.....	104
Figure 29 : Conséquences induites par la surexpression de Tbx3 sur le couplage intercellulaire.....	105
Figure 30 : Phénotype contractile des cardiomyocytes néonataux 48 H après infection. ....	106
Figure 31 : Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine. ....	107

## LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : virus adéno-associés.

Ad : Adénovirus.

AC : Adénylate cyclase.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

ADRB2 : Récepteur  $\beta$ 2-adrénergique.

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.

ANOVA : Analyse de Variance.

ARNm: Acide RiboNucléique messenger.

ATP : Adénosine-triphosphate

AV : Auriculo-ventriculaire.

BAV : Bloc auriculo-ventriculaire.

BAVc : Bloc auriculo-ventriculaire complet.

BSA : Bovine Serum Albumine.

BPM : Battements par minute.

CaMKII :  $Ca^{2+}$ /calmoduline dépendante II.

CMV : Cytomegalovirus.

Cx : Connexine.

CI : Cell index.

CNBD : Cyclic nucleotide-binding domain.

CNG : Cyclic Nucleotide Gated Channel.

GYG : Glycine-Tyrosyne-Glycine.

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole.

diC8-PIP2 : Dioctanoyl phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

ECG : Electrocardiogramme.

EDTA : Ethylène-Diamine-Tétracétique.

EGTA : Acide éthylène glycol tetracétique.

EPO : Erythropoïétine.

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching.

Gap-FRAP : Gap Fluorescence Recovery After Photobleaching.

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

GFP : Green Fluorescent Protein.

HBSS : Hank's Buffered Salt Solution.

HCN : Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated.

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase.

HRP : Horseradish peroxidase.

KCR1 : K<sup>+</sup> Channel Regulator.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Dihydrogénophosphate de potassium.

KCNE2 : Potassium voltage-gated channel subfamily E member 2.

PA : Potentiel d'action.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

PLB : Phospholamban.

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride.

LCR: Libération locale de Ca<sup>2+</sup>.

MIRP1 : MinK-related peptide 1.

MOI : Multiplicity of infection

Nkx2.5 : Facteur de transcription à homéoboîte Nkx2.5.

PCR : Polymerase chain reaction.

PI(4,5)P<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

PKA : Protéine Kinase A.



PLB : Phosphorylation du phospholamban.

RyR : récepteurs à la ryanodine.

RT-PCR : Reverse transcription - polymerase chain reaction.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

Shox2 : Facteur de transcription à homéodomaine.

SVF : Sérum de Veau Fœtal.

TBS-T : Tris Buffer Saline Tween.

Tbx3 : Facteur de transcription T-box3.

Tbx18 : Facteur de transcription T-box18.

TTX : Tétrodotoxine.

TV : Tachycardie ventriculaire.

## **AVANT-PROPOS**

Le rythme normal cardiaque est commandé par une région spécifique située dans l'oreillette droite, le nœud sinusal, constitué de cellules douées d'automatisme appelés cellules pacemaker. Ces cellules engendrent spontanément, grâce à des propriétés électriques bien identifiées, des influx électriques qui vont se propager à l'ensemble du myocarde à travers le système de conduction. Cette activité électrique spontanée est la résultante de courants ioniques traversant la membrane plasmique.

Tout dysfonctionnement des cellules pacemaker ou tout défaut de la conduction de l'influx électrique peuvent être à l'origine de blocs de conduction sévères. A l'heure actuelle la seule thérapie efficace est l'implantation d'un stimulateur électronique. Cependant, le pacemaker électronique reste un traitement palliatif et non curatif, présentant de nombreux inconvénients. C'est pour ces raisons que l'idée de développer un pacemaker bio-artificiel a émergé. Plusieurs stratégies, telles que la thérapie cellulaire ou la thérapie génique ont été employées pour le développement des pacemakers bio-artificiels. Ces stratégies nécessitent pour la plupart l'utilisation de vecteurs viraux pour pouvoir exprimer le ou les gènes d'intérêt permettant la genèse d'une activité spontanée dans les cellules quiescentes. Or, ces virus ont des pouvoirs pathogènes, limitant ainsi l'expression à long terme des transgènes.

Au cours de ces dernières années, des vecteurs non-viraux ont vu le jour et la faisabilité de les utiliser au niveau cardiaque pour développer des pacemakers bio-artificiels a été démontrée par notre équipe. Un rythme d'échappement propre à notre pacemaker permet de prolonger la survie de souris en bloc auriculo-ventriculaire complet. Cependant, ce rythme reste lent et une hypertrophie précoce se développe chez ces souris. Le travail exposé dans cette thèse avait pour objectif d'optimiser ces pacemakers bio-artificiels.

## **INTRODUCTION**

### **A. GENESE DE L'AUTOMATISME CARDIAQUE**

#### **I. Automatisme Cardiaque**

Chez les mammifères, l'activité électrique cardiaque spontanée est initiée par une région hautement spécialisée du cœur, le nœud sinusal (ou nœud sino-atrial). En effet, bien que d'autres régions cardiaques, telles que le nœud auriculo-ventriculaire et le faisceau de His présentant également une activité automatique intrinsèque, ce sont les cellules du nœud sinusal qui imposent leur rythme à l'ensemble du myocarde. Le nœud sinusal agit ainsi comme le foyer autonome (pacemaker) dominant du cœur.

Cependant, dans certaines pathologies les activités automatiques du nœud auriculo-ventriculaire ou des fibres de Purkinje (pacemakers latents ou secondaires) peuvent devenir prédominantes, c'est le cas lors d'une dysfonction sinusale (bradycardie et/ou pauses sinusales) ou d'un arrêt sinusal (James, 2003) et lors d'un bloc auriculo-ventriculaire complet.

##### **1. Déterminants moléculaires régulant la formation du nœud sinusal**

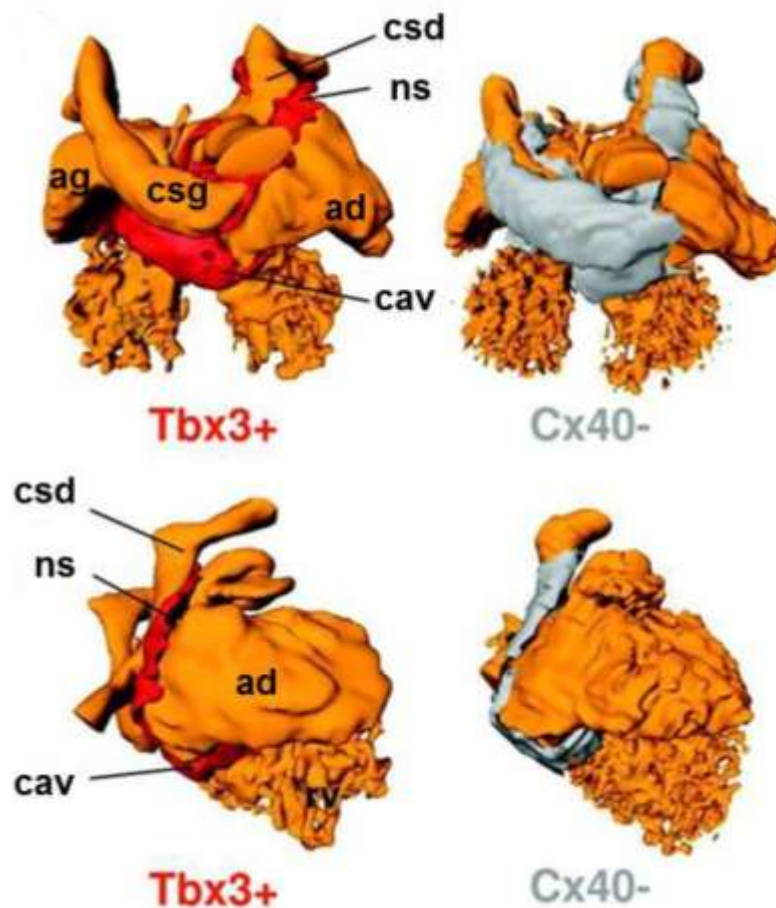
Au début de l'embryogenèse cardiaque, la totalité des cardiomyocytes présentent une activité automatique et une vitesse de conduction lente (Moorman et Christoffels., 2003). C'est au cours de la formation des différentes chambres cardiaques et de la différenciation de ces cellules en cardiomyocytes contractiles que ces propriétés disparaissent. En effet, les cellules du myocarde contractile ne sont plus douées d'automatisme et se caractérisent par une

vitesse de conduction plus rapide (Pennisi et coll., 2002 ; Moorman et Christoffels., 2003). Dans le cœur adulte, c'est uniquement au niveau du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire que les cardiomyocytes conservent leurs propriétés embryonnaires. De nombreuses études ont été réalisées dans le but d'identifier les facteurs de transcription responsables du maintien de ce phénotype embryonnaire des cellules automatiques, permettant ainsi la formation du nœud sinusal (Hoogaars et coll., 2007 ; Mommersteeg et coll., 2007 ; Moorman et Christoffels., 2003).

Dans le cœur embryonnaire, le nœud sinusal se situe au niveau de la partie droite de l'oreillette primitive (atrium) près du sinus veineux (figure 1). Cette région se caractérise par l'expression du facteur de transcription T-box3 (Tbx3) et du gène codant pour le canal pacemaker HCN4. Au contraire elle est dépourvue de l'expression de Connexine 40 (Cx40). Cette connexine, à conductance rapide, est exprimée au niveau du myocarde contractile auriculaire et dans le tissu conducteur ventriculaire (Miquerol et coll., 2004 ; Mommersteeg et coll., 2007 ; Christoffels et coll., 2010).

L'analyse, pendant le stade embryonnaire à E 12,5 - 14,5, des cœurs de souris Tbx3<sup>-/-</sup> a permis de montrer que ce facteur de transcription est essentiel pour l'activation du programme d'expression des gènes du nœud sinusal (Hoogaars et coll., 2007). A l'inverse, il réprime l'expression des gènes marqueurs du myocarde contractile. De ce fait, Tbx3 joue un rôle majeur dans la régulation du programme d'expression de gènes du nœud sinusal (Hoogaars et coll., 2007) et réprime ainsi la formation des chambres cardiaques. Hoogaars et ses collaborateurs ont de plus montré, que la surexpression conditionnelle de Tbx3 au niveau atrial, sous influence d'un promoteur cardiaque inductible chez des souris, permettait la formation de foyers automatiques ectopiques au niveau atrial. L'expression ectopique de ce facteur de transcription est donc suffisante pour réprimer le phénotype auriculaire et imposer ainsi un phénotype sinusal.

Cependant, l'étude des cœurs embryonnaires de souris  $Tbx3^{-/-}$  ne révèle pas de changement dans la morphologie du nœud sinusal.  $Tbx3$  ne joue donc pas un rôle dans la formation initiale du nœud sinusal mais participe à la différenciation terminale des cellules du nœud sinusal (Hoogaars et coll., 2007). C'est le facteur  $Tbx18$ , exprimé au niveau du nœud sinusal, qui a été décrit comme participant à la formation du nœud sinusal. Il contribuerait à la mobilisation ou à la différenciation de cellules précurseurs du nœud sinusal (Wiese et coll., 2009)



**Figure 1 : Reconstruction tridimensionnelle du cœur embryonnaire de souris à E14.5.**

Dans cette reconstruction le myocarde ventriculaire gauche a été omis. Vue dorsale du cœur (haut) et vue du côté droit (bas). La région du myocarde exprimant  $Tbx3$  ( $Tbx3+$ ) est représentée en rouge, et la région n'exprimant pas la connexine 40 (connexine 40) est en gris. Notons que l'expression de  $Tbx3$  est limitée à la région où la connexine 40 n'est pas exprimée. Abréviations : ad, atrium droit ; ag, atrium gauche ; cav, canal atrio-ventriculaire ; csd, corne sinusale droite ; csg, corne sinusale gauche ; ns, nœud sinusal. D'après Soufan et coll., 2003.

En revanche, il a été décrit que le facteur de transcription Nkx2.5, appartenant à la famille des facteurs de transcription à homéoboîte (Harvey et coll. 1996), agirait comme un répresseur du programme d'expression de gènes du nœud sinusal (Espinoza-Lewis et coll., 2011). En effet, des souris hétérozygotes Nkx2.5<sup>+/-</sup> (Biben et coll., 2000) développent une expression ectopique de Tbx3 et de HCN4 dans le tube cardiaque. Nkx2.5 est donc essentiel pour réprimer l'expression de Tbx3 en dehors de la région du nœud sinusal et permettre ainsi l'expression des gènes marqueurs du myocarde atrial (Mommersteeg et coll., 2007).

D'autres études ont démontré que le facteur de transcription à homéodomaine Shox2, pouvait jouer un rôle dans la formation du nœud sinusal. En effet, les embryons de poisson zèbre (*Danio reiro*) Shox2<sup>-/-</sup> présentent une bradycardie. De plus les souris Shox2<sup>-/-</sup> ont une hypoplasie du nœud sinusal et meurent *in utero* à E12. Ces observations ont ainsi permis d'affirmer que Shox2 est une protéine essentielle à la formation de ce tissu pacemaker (Blaschke et coll., 2007). En 2009, Espinoza-Lewis et ses collaborateurs ont démontré que Shox2 permettait le maintien du phénotype automatique des cellules sinusales par la répression qu'il exerce sur le facteur de transcription Nkx2.5 (Espinoza-Lewis et coll., 2009 et 2011). Toutefois, Shox2 ne peut pas à lui seul assurer la formation du nœud sinusal. En effet, une surexpression conditionnelle de Shox2 pendant le stade embryonnaire dans l'ensemble du cœur des souris transgéniques, grâce à l'utilisation du système Cre/loxP, n'a pas permis l'apparition de foyers automatiques ectopiques, ni l'expression ectopique de marqueurs du nœud sinusal tels que Tbx3 et HCN4 (Espinoza-Lewis et coll., 2011).

Ces différents travaux suggèrent que le nœud sinusal semble être constitué par une population de cellules non recrutées par le programme d'expression des gènes permettant la formation du myocarde contractile.

## 2. Le nœud sinusal

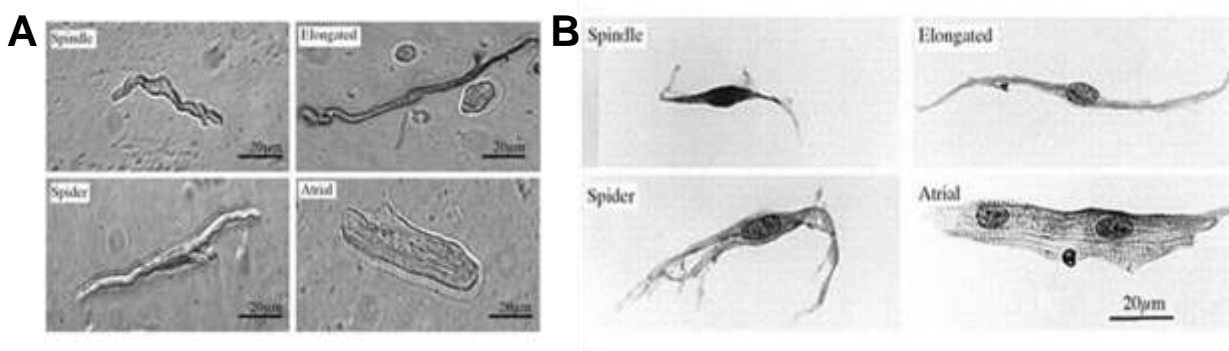
Le pacemaker physiologique du muscle cardiaque est le nœud sinusal, structure localisée dans l'oreillette droite à la jonction entre la *crista terminalis*, une crête musculaire qui relie les parties antérieures des orifices des veines caves supérieure et inférieure et le septum inter-atrial (Boyett et coll., 2000).

Le nœud sinusal est un tissu complexe et hétérogène, malgré sa relative petite taille. Sa fonction dépend exclusivement de cette complexité. Cette région est ainsi composée par des cardiomyocytes, présentant une activité automatique spontanée, appelées « cellules pacemakers », mais également des cellules atriales, des fibroblastes, des adipocytes et des fibres de collagène (Dobrzynski et coll., 2005). Le réseau de fibres de collagène contenu dans le nœud sinusal est très abondant (Ophthof et coll., 1987) et augmente en quantité avec l'âge. Pendant le vieillissement, la taille et la position du nœud sinusal sont invariables. Cependant, Il va subir un remodelage associé à une augmentation de la densité en collagène (Alings et coll., 1995). Toutefois, à ce jour, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre un ralentissement de la conduction avec l'âge et l'évolution du contenu du tissu nodal en collagène.

L'architecture anatomique autant qu'électrique du nœud sinusal permet de pouvoir activer l'importante masse atriale l'entourant sans que son activité automatique ne soit, en retour, inhibée par les cellules atriales plus hyperpolarisées. Au-delà des nombreux courants ioniques qui permettent l'activité du nœud sinusal, l'architecture anatomique permettant une barrière électrique, la présence de cellules transitionnelles et la notion de découplage électrique au sein même du tissu nodal contribuent également au fonctionnement de ce foyer automatique (Mangoni et Nargeot, 2008).

La structure complexe du nœud sinusal abrite des populations cellulaires morphologiquement et fonctionnellement différentes qui coexistent pour produire l'activité automatique, en réponse à un large spectre d'influences hormonales et neuronales (DiFrancesco et coll., 1986 ; Mangoni et Nageot, 2001 ; Mangoni et coll., 2001 ; Verheijck et coll., 1998).

Ainsi, quatre types de cellules pacemakers ont été décrits dans le nœud sinusal et la morphologie de ces cellules est considérablement conservée entre les différentes espèces. Les cellules nodales faiblement striées ont été identifiées et classées, selon leurs morphologies, en trois types cellulaires : les cellules en fuseau allongé (*elongated spindle cells*), les cellules en fuseau (*spindle cells*) et les cellules en forme d'araignée (*spider cells*) (figure 2). Elles sont distribuées aléatoirement du centre vers la périphérie du sinus et présentent une activité électrique spontanée aux propriétés non distinctes (DiFrancesco et coll., 1986 ; Mangoni et Nageot., 2001 ; Mangoni et coll., 2001 ; Verheijck et coll., 1998). Le quatrième type cellulaire, en forme de baguette (*rod-shaped cells*), est du fait de ses striations, de sa quiescence et de ses propriétés électrophysiologiques, de type atrial.



**Figure 2 : Morphologie des cellules du nœud sinusal et des cellules atriales.**

(A) Cellules isolées à partir d'une oreillette de cœur de souris. D'après Mangoni et Nageot, 2001 (B) Cellules pacemakers et atriales isolées de lapin. On distingue 4 morphologies cellulaires différentes : les cellules en fuseau allongées (*elongated spindle cells*), les cellules en fuseau (*spindle cells*), les cellules en formes d'araignées (*spider cells*) et les cellules atriales. D'après Verheijck et coll., 1998.

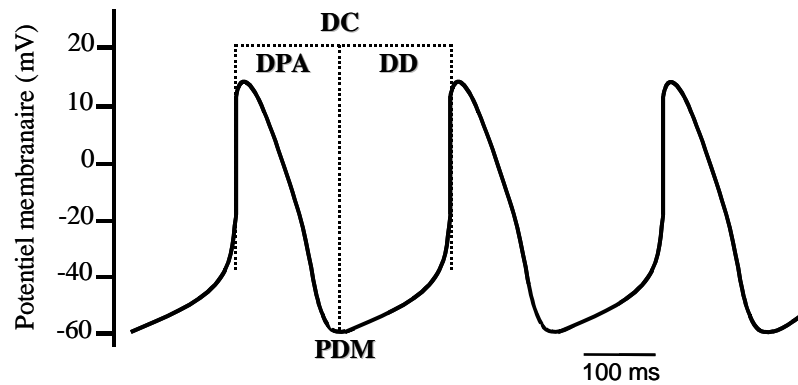


Enfin les fibroblastes forment un très vaste réseau dans le nœud sinusal (Camelliti et coll., 2004 ; De Maziere et coll., 1992). Camelliti et ses collaborateurs ont montré que les fibroblastes peuvent être fonctionnellement couplés avec les cellules pacemakers du nœud sinusal, probablement via les jonctions *gap*, telles que les connexines 45 (Cx45). Toutefois, les fibroblastes du nœud sinusal ne participent pas à la conduction intranodale (De Maziere et coll., 1992) mais pourraient jouer un rôle dans la transduction du stress mécanique de la paroi atriale aux myocytes du nœud sinusal (Kohl et coll., 1994). Les fibroblastes participeraient ainsi à la régulation mécano-électrique de la fréquence du nœud sinusal.

### 3. Automatisme dans le nœud sinusal

L'influx électrique naît au niveau du nœud sinusal. Cette genèse est possible grâce à la présence dans cette région de myocytes doués d'une activité automatique. Ces cellules présentent un potentiel d'action différent des cellules du myocarde contractile. En effet, les cellules automatiques sont caractérisées non pas par un potentiel de repos, comme c'est le cas pour les cardiomyocytes ventriculaires, mais par un potentiel diastolique maximal qui initie une pente de dépolarisation diastolique lente permettant d'atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action suivant (figure 3). C'est ainsi que l'activité électrique spontanée des cellules du nœud sinusal se traduit par l'émergence cyclique de potentiels d'action responsables de la propagation de l'excitation électrique à travers le cœur.

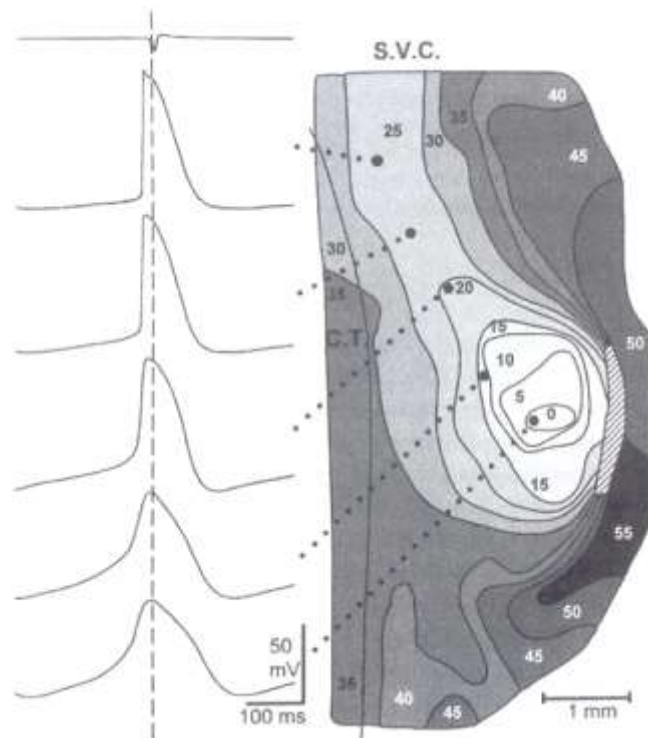
Le potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal est caractérisé par son potentiel diastolique maximal faible (entre -60 et -50 mV), sa dépolarisation diastolique spontanée et lente, et un potentiel d'action dont la phase de dépolarisation est lente, l'amplitude faible et la durée longue (Mangoni et Nargeot, 2001 ; figure 3).



**Figure 3 : Potentiel d'action spontané des cellules du nœud sinusal.**

PDM, potentiel diastolique maximal ; DC, durée du cycle ; DPA, durée du potentiel d'action ; DD, dépolarisation diastolique. D'après Mangoni et Nargeot, 2001.

L'activité électrique des cellules du nœud sinusal évolue graduellement du centre vers la périphérie (Janse et coll., 1976). Les cellules sinusales centrales sont caractérisées par un potentiel diastolique maximal faible (c'est-à-dire moins négatif), une pente de dépolarisation diastolique forte et des potentiels d'action présentant une vitesse de dépolarisation lente, une amplitude faible et une durée longue. Du centre vers la périphérie du nœud et jusqu'au tissu atrial, le potentiel diastolique maximal des cellules s'hyperpolarise, la pente de dépolarisation diastolique devient plus faible et les potentiels d'action se caractérisent par une vitesse de dépolarisation plus rapide, une amplitude plus importante et une durée plus courte ((Janse et coll., 1976 ; Boyett et coll., 1999 ; Mangoni et Nargeot, 2008 ; figure 4). L'hétérogénéité fonctionnelle observée entre la zone centrale et la zone périphérique du nœud sinusal s'explique par une expression variable des différents canaux ioniques impliqués dans la genèse des potentiels d'action.



**Figure 4 : Cartographie des différents potentiels d'action lors de la propagation de l'excitation dans le nœud sinusal du lapin.**

Les traits délimitent les zones excitées par pas de 5 ms. Les nombres correspondent au temps d'activation en ms. Les potentiels d'action enregistrés du centre du nœud sinusal au tissu atrial sont figurés à gauche. Vers la périphérie, les potentiels d'action présentent une amplitude et une vitesse de dépolarisation augmentées tandis que la pente de dépolarisation diastolique diminue (Janse et coll., 1976).

Les cellules situées à la périphérie du nœud sinusal ont un rythme intrinsèque plus rapide que les cellules du centre. Cependant, ce sont les cellules de la zone centrale qui imposent le rythme issu du nœud sinusal en raison de l'inhibition de la pente diastolique des cellules périphériques par les cellules atriales voisines (Boyett et coll., 2000).

La propagation de l'excitation électrique, du nœud sinusal vers les cellules atriales, est non seulement due au gradient d'activité électrique de ces cellules pacemakers, mais également à une variation de l'expression des jonctions *gap*. Un gradient de vitesse de conduction est ainsi créé depuis le centre du nœud sinusal vers sa périphérie (Joyner et coll.,

1986 ; Zhang et coll., 2001 ; Boyett et coll., 2006). La vitesse de conduction au niveau des cellules pacemakers, situées au centre est très lente par rapport à celle mesurée à la périphérie du nœud sinusal (Boyett et coll., 2006). La connexine 45 (Cx45) ainsi que la connexine 30.2 (Cx30.2) sont toutes les deux exprimées au niveau du nœud sinusal et du nœud atrio-ventriculaire chez la souris (Kreuzberg et coll., 2005). La Cx30.2 possède une conductance plus faible que la Cx45 (Bukauskas et coll., 2006). Il a été proposé que la connexine Cx30.2 soit ainsi responsable du faible couplage électrique et de la vitesse de conduction lente caractéristiques du centre du nœud sinusal (Kreuzberg et coll., 2006). Notons que l'expression de la connexine 43 (Cx43) à la périphérie du nœud sinusal contribue à améliorer le couplage électrique entre les cellules, formant ainsi une zone transitionnelle, entre la faible conductance des cellules pacemakers et la forte conductance des cellules atriales (Dobrzynski et coll., 2005).

#### 4. Automatisme dans le nœud auriculo-ventriculaire

Le nœud auriculo-ventriculaire (AV) impose un délai de conduction électrique approprié entre les oreillettes et les ventricules entraînant un décalage entre l'activation des oreillettes et des ventricules (Meijler et Janse, 1988). Cette période réfractaire, qui s'étale après la repolarisation, lui permet de bloquer les battements prématurés ou trop rapides et protège ainsi les ventricules des troubles du rythme supraventriculaires tels que la fibrillation auriculaire. Il joue donc un rôle protecteur du rythme ventriculaire (Mangoni et Nargeot, 2008).

Le nœud AV est également doué d'une activité automatique intrinsèque. C'est d'ailleurs un pacemaker subsidiaire lors de dysfonctions sinusales ou de blocs de conduction entre les oreillettes et ce même nœud AV.

Le nœud AV possède deux voies de conduction, une voie de conduction dite rapide et une voie lente (Moe et coll., 1956 ; Nikolski et coll., 2001). Mais, par rapport à la conduction atriale, il se caractérise, dans l'ensemble, par une conduction lente. Cette vitesse lente de conduction est liée à la petite taille des cellules, au faible nombre de communications intercellulaires et au réseau complexe de fibres qui sont séparées par du tissu conjonctif. Ces caractéristiques, au moins pour les deux dernières, sont autant de points faibles théoriquement rencontrés lors de l'établissement d'un foyer d'automatisme dans le muscle ventriculaire. De plus, la dépolarisation des cellules du nœud AV est principalement sous la dépendance des canaux calciques, ce qui participe au ralentissement de la conduction dans le nœud (Kléber et coll., 2001).

#### 5. Automatisme dans les fibres de Purkinje

L'activité électrique née dans le nœud sinusal et propagée dans les oreillettes puis le nœud AV gagne ensuite le faisceau de His, ses branches et le réseau de Purkinje pour activer l'ensemble du myocarde ventriculaire.

Le faisceau de His se détache de la partie antérieure du nœud AV et se porte en avant sur la face droite du septum interventriculaire pour pénétrer dans le noyau fibreux central. Lorsqu'il atteint le bord inférieur du septum membraneux, il se divise en deux branches, une droite et une gauche. La branche droite du faisceau de His se propage dans la direction du tronc commun, sous l'endocarde de la face droite du septum, puis dans le myocarde. La branche gauche du faisceau de His s'étale largement sous la partie antérieure du septum membraneux, proche de l'endocarde du ventricule gauche. Chez l'homme, l'anatomie de la branche gauche est sujette à une importante variabilité. Le plus souvent, la branche gauche traverse le septum sous forme d'une large bande en dessous de la sigmoïde aortique. Elle se

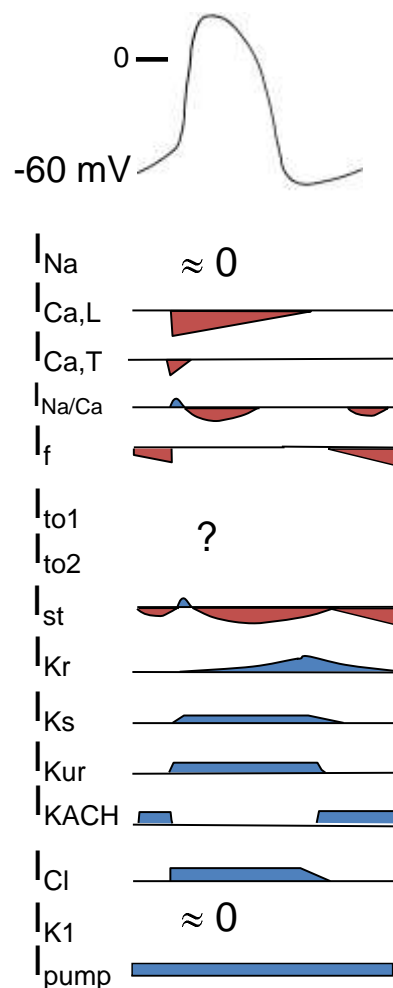
divise ensuite en un grand nombre de fibres très fines disposées en un faisceau postéro-inférieur et un faisceau antéro-supérieur. Les branches droite et gauche du faisceau de His se transforment ensuite en un réseau formant les fibres de Purkinje s'étalant à la surface de l'endocarde des ventricules. L'entrelacement très important de ces fibres permet à l'influx électrique d'atteindre quasiment l'ensemble de l'endocarde des ventricules droit et gauche. Récemment une telle asymétrie du système His-Purkinje, similaire à celle observée chez les plus gros mammifères et l'homme, a été mise en évidence chez la souris (Miquerol et coll., 2004).

Les fibres du faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje sont donc responsables de la propagation rapide de l'influx électrique du nœud AV vers les ventricules. Ces voies de conduction constituent également des zones potentielles de foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement en cas de bloc AV. Elles servent alors de foyers d'automatisme secondaires comme peuvent l'être les cellules du nœud AV, bien que le rythme qu'elles imposent soit relativement lent par rapport aux deux autres foyers automatiques.

## **II. Les mécanismes ioniques générant l'automatisme**

Il existe différents mécanismes ioniques permettant la genèse des potentiels d'actions spontanés (figure 5). Parmi ces mécanismes on retrouve le courant entrant  $I_f$  activé par l'hyperpolarisation ; le courant calcique de type L,  $I_{Ca,L}$ ; le courant entrant sodique soutenu,  $I_{st}$  ; le courant calcique de type T,  $I_{Ca,T}$ , et l'échangeur sodium-calcium,  $I_{NCX}$  (Seifert et coll., 1999 ; Bohn et coll., 2000 ; Zhang et coll., 2002). La repolarisation des cellules sinusales dépend de plusieurs courants potassiques distincts : les courants potassiques à rectification retardée,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kur}$  et le courant sortant transitoire,  $I_{to}$ . En général, la régulation de

l'automatisme des cellules du nœud sinusal est considéré comme étant dû au courant calcique  $I_{Ca,L}$ , à la désactivation dépendante du temps des canaux potassiques et au courant  $I_f$  (Noble, 1984 ; Irisawa et coll., 1993). Le courant calcique  $I_{Ca,L}$  est l'un des courants pacemakers le plus important, puisque la genèse du potentiel d'action pacemaker est presque identique au potentiel d'activation de  $I_{Ca,L}$ . Des antagonistes calciques stoppent l'activité spontanée des cellules spontanées. A faible concentration, ces antagonistes suppriment et ralentissent la dernière partie de la dépolarisation (Sato et Tsuchida, 1993). La contribution du courant calcique  $I_{Ca,T}$  est limitée approximativement au premier tiers de la dépolarisation (Noble, 1984). En effet, les canaux calciques de type T s'activent à partir de  $-70$  mV, de manière similaire aux canaux sodiques (Sato, 1995).



**Figure 5 : Schéma illustrant les propriétés électrophysiologiques des cellules pacemakers indiquant la contribution des différents canaux ioniques à la genèse des potentiels d'action.**

## 1. Le courant « pacemaker » $I_f$

L'ensemble des cellules douées d'une activité automatique expriment les canaux pacemakers HCN (Baruscotti et coll., 2005). Ces canaux sont responsables du courant  $I_f$ . De nombreux travaux ont proposé que le principal courant ionique responsable de l'automatisme cardiaque est le courant de pacemaker,  $I_f$  (DiFrancesco, 1993, DiFrancesco, 2006). Ce courant fut décrit pour la première fois dans le nœud sinusal de lapin, il fut nommé « *funny current* » du fait de ces nombreuses caractéristiques inhabituelles (Brown et coll., 1979).

Le courant  $I_f$  est porté par les canaux HCN. Le génome code pour quatre isoformes HCN nommés HCN1, HCN2, HCN3 et HCN4. Le clonage des canaux de la famille HCN à la fin des années 1990 (Clapham, 1998) eut lieu presque vingt ans après sa description originale. Le premier membre de cette famille fut cloné à partir du cerveau de souris (Santoro et coll., 1997 et 1998), et les autres membres furent clonés peu de temps après (Ludwig et coll., 1998 ; Ludwig et coll., 1999 ; Vaccari et coll., 1999 ; Ishii et coll., 1999 ; Seifert et coll., 1999).

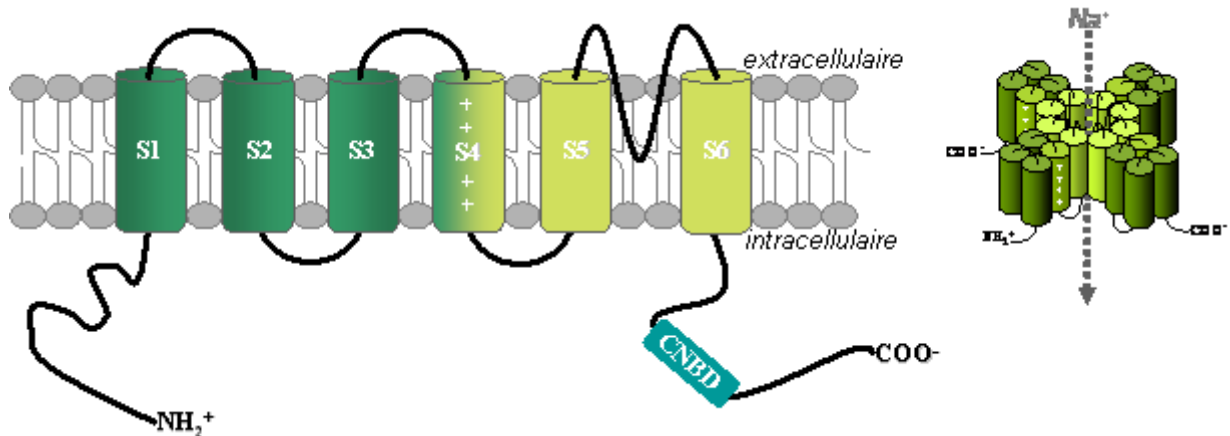
Les canaux HCN présentent une structure typique des canaux potassiques potentiel-dépendants (figure 6). La structure primaire est composée de six segments transmembranaires, un segment S4 chargé positivement et une séquence d'acides aminés GYG (glycine-tyrosine-glycine) au niveau du filtre de sélectivité du pore canalaire. Le canal HCN présente également une similarité avec les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG, *cyclic nucleotide-gated channel*) étant donné la présence du domaine de fixation des nucléotides cycliques, (CNBD, *cyclic nucleotide-binding domain*) au niveau de l'extrémité C-terminale.

Les caractéristiques de ces canaux HCN à l'origine de  $I_f$  sont au nombre de trois (DiFrancesco, 1993 ; Pape, 1996).

Tout d'abord, ce courant s'active suite à une hyperpolarisation membranaire. Le seuil d'activation de ces canaux se situe, dans le nœud sinusal ainsi que dans le nœud AV, aux



environs de  $-50$  à  $-60$  mV (Baruscotti et coll., 2005). Dans les fibres de Purkinje, ce courant s'active pour des valeurs de potentiel plus négatives (DiFrancesco, 1981). La figure 7 illustre une courbe d'activation typique. Cette relation de la fraction de canaux ouverts en fonction du potentiel membranaire nous révèle que le courant est activé à des potentiels comprenant la gamme de dépolarisation diastolique.



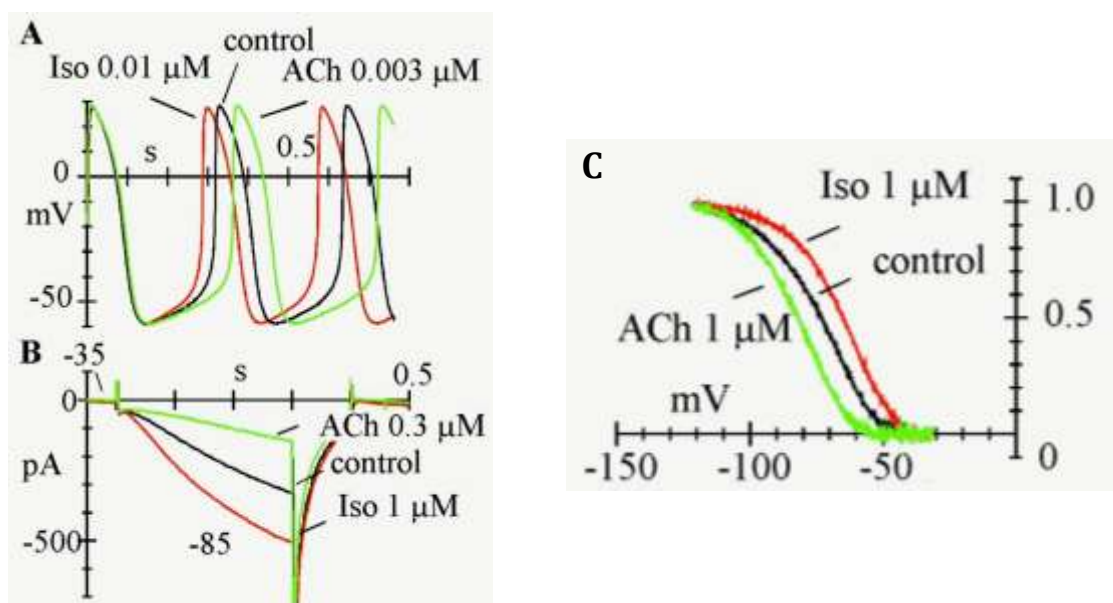
**Figure 6 : Représentation schématique de la sous-unité  $\alpha$  et de la structure tétramérique du canal HCN.**

Pour être fonctionnel le canal HCN doit s'associer en tétramère. Il est ainsi formé par l'association de 4 sous-unités principales  $\alpha$  à 6 segments transmembranaires chacune. Ces quatre sous-unités  $\alpha$  forment le pore ionique.

Deuxièmement,  $I_f$  est un courant cationique non spécifique entrant, porté par les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ) (Accili et coll., 2002). Une perméabilité pour les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a également été décrite dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats (Yu et coll., 2007). C'est la genèse de ce courant dépolarisant qui permet de dépolariser la membrane des cellules du nœud sinusal jusqu'au seuil d'activation des canaux calciques et ainsi de maintenir l'automatisme.

Enfin, la stimulation du système nerveux autonome modifie la dépendance au potentiel de l'activation du canal HCN, conduisant à une modification de la pente de dépolarisation

diastolique et par voie de conséquence de la fréquence de l'automatisme. Les agonistes  $\beta$ -adrénergiques augmentent  $I_f$  en déplaçant la courbe d'activation des canaux vers des potentiels moins négatifs. Cela conduit à une augmentation de la pente de dépolarisation diastolique et à une accélération de la fréquence cardiaque. A l'inverse, les agonistes muscariniques réduisent  $I_f$  en déplaçant la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs. La pente de dépolarisation est ainsi réduite et la fréquence cardiaque est alors diminuée. Ce déplacement de la courbe d'activation du canal HCN est dû à la stimulation ou à l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par les protéines G couplées aux récepteurs du système nerveux autonome, responsable d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration intracellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Di francesco, 1993 ; Di francesco et coll., 1994 ; figures 7).

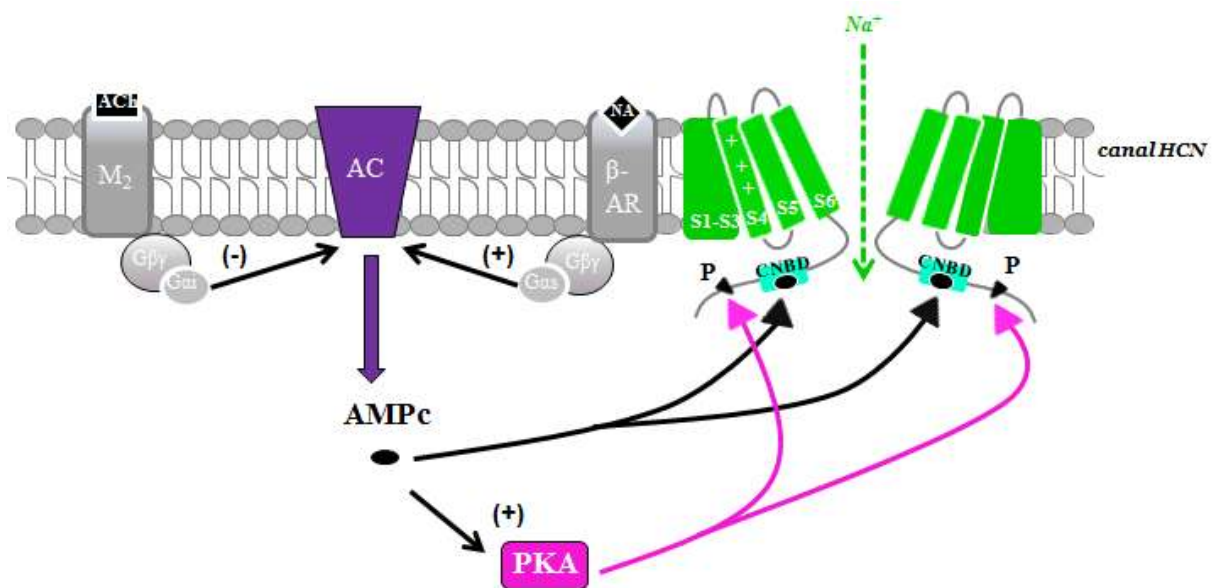


**Figure 7 : Effets des agonistes sur l'activité pacemaker et sur le courant  $I_f$  des cellules du nœud sinusal de lapin.**

(A) Potentiels d'action spontanés des cellules du nœud sinusal de lapin enregistrés en condition contrôle et en présence d'isoprénaline (Iso) ou d'acétylcholine (ACh). (B) Courant  $I_f$  enregistré suite à une hyperpolarisation à  $-85 \text{ mV}$  à partir d'un potentiel de maintien de  $-35 \text{ mV}$ . L'amplitude du courant augmente avec l'isoprénaline (Iso) et diminue avec l'acétylcholine (ACh). (C) Courbe d'activation qui reflète la fraction de canaux ouverts à différents potentiels en condition contrôle (control) et durant la perfusion des agonistes (Accili et coll., 1997).

L'AMPC ainsi produit est capable de se lier directement au canal HCN (Bois et coll., 1997), au niveau du domaine CNBD et ainsi d'accélérer les cinétiques d'activation et de déplacer la dépendance au potentiel de cette activation vers des potentiels moins négatifs. La modulation par l'AMPC peut être interprétée en tant que modèle allostérique, puisque l'AMPC se fixe préférentiellement sur les canaux à l'état ouvert et les bloque dans cet état ouvert (figure 8).

Une étude a récemment démontré qu'il existe une voie indirecte de régulation des canaux HCN par l'AMPC, via l'activation de la Protéine Kinase A (PKA). Liao et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans des cellules sinusales de souris, que la PKA pouvait réguler l'isoforme HCN4 via des sites de phosphorylation spécifiques au niveau de sa partie distale C-terminale. Elle participe ainsi à la régulation  $\beta$ -adrénergique de ces canaux (Liao et coll., 2010).



**Figure 8 : Régulation  $\beta$ -adrénergique des canaux HCN.**

Schéma d'une portion de membrane cellulaire du nœud sinusal indiquant la régulation des canaux HCN par la stimulation ou l'inhibition de la synthèse de l'AMPC. M<sub>2</sub>, récepteur muscarinique de type 2 ; ACh, acétylcholine ; AC, adénylate cyclase ; G $\alpha$ i (sous-unité inhibitrice de l'AC) et G $\beta\gamma$ , sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  de la protéine G ;  $\beta$ -AR, récepteur  $\beta$ -adrénergique ; G $\alpha$ s, sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (sous-unité stimulatrice de l'AC) ; PKA, Protéine Kinase A.

## 1.1 Les différents gènes HCN et leurs rôles dans l'automatisme

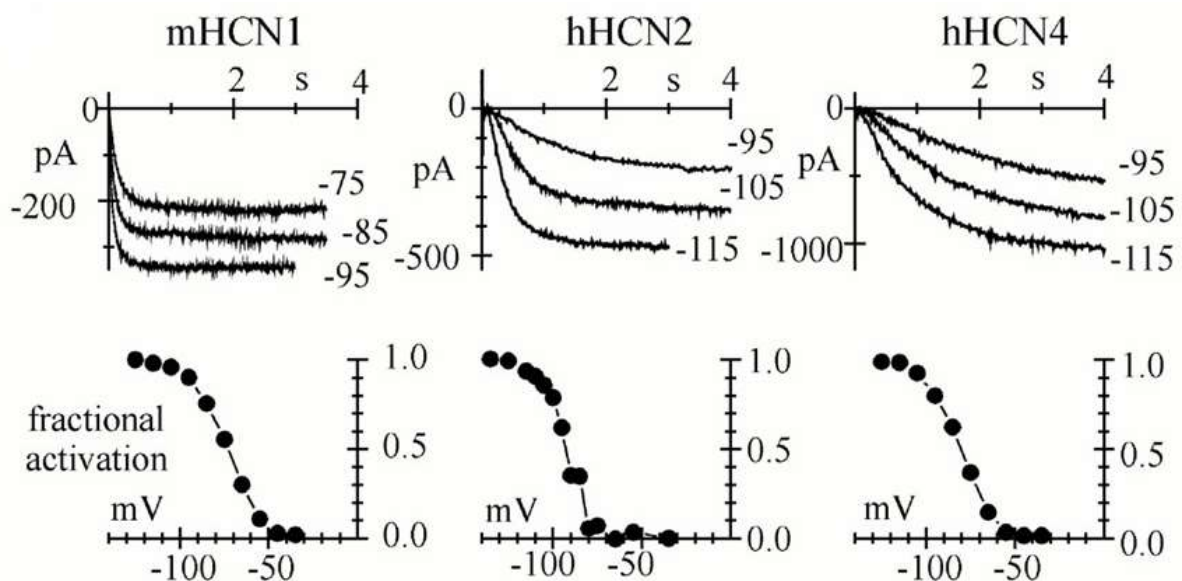
Parmi les quatre gènes HCN, tous sont, à l'exception de HCN3, exprimés au niveau transcriptionnel dans le cœur.

Le niveau d'expression des trois gènes HCN1, HCN2 et HCN4 varie en fonction de la région cardiaque, de l'espèce, de l'âge et de l'état physiologique ou pathologique du cœur. HCN4 est l'isoforme majoritaire dans le nœud sinusal adulte et dans le nœud AV dans toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant (lapin, souris, homme) (Moosmang et coll., 2001 ; Shi et coll., 1999 ; Brioschi et coll., 2009). L'isoforme HCN1 est exprimé dans le nœud sinusal de lapin, mais est très faiblement exprimé chez la souris, au contraire de HCN2 exprimé de manière modérée dans le nœud sinusal de souris.  $I_f$  chez la souris est donc conduit principalement par l'isoforme HCN4 (Brioschi et coll., 2009), le courant restant l'étant par HCN2. Mais,  $I_f$  peut aussi être généré par des structures canalaire hétéromériques, c'est-à-dire composées de monomères codés par des gènes différents. Tout comme les hétéromères HCN1-HCN2 (Chen et coll., 2001) et HCN1-HCN4 (Altomare et coll., 2003), la formation d'hétéromères HCN2-HCN4 a été décrite dans des tissus natifs (Whitaker et coll., 2007).

L'expression du gène HCN4 est restreinte aux régions cardiaques douées d'automatisme. Les formes transcrites et les protéines HCN4 sont fortement exprimées de manière sélective dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et dans les fibres de Purkinje. Quant à HCN2, ses transcrits sont exprimés à des niveaux significatifs dans des cardiomyocytes non automatiques au niveau des oreillettes et des ventricules. Au contraire de HCN4, HCN2 se caractérise donc par une distribution cardiaque ubiquitaire, avec une absence ou une faible sélectivité pour les tissus de conduction.

Les courants produits par l'expression des trois isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 sont tous activés par des hyperpolarisations mais présentent des cinétiques d'activation et de

désactivation relativement différentes. C'est l'isoforme HCN1 qui possède les cinétiques les plus rapides, suivi ensuite par HCN2 puis HCN4 (Altomare et coll., 2001). Les courants enregistrés dans les cellules HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) exprimant les gènes HCN1 de souris, HCN2 humain et HCN4 humain ainsi que leurs courbes d'activation et de constante de temps d'activation sont illustrés dans la figure 9. Le potentiel de demi-activation ( $V_{1/2}$ ) de la courbe d'activation, c'est-à-dire le potentiel membranaire pour lequel la moitié des canaux ioniques sont à l'état ouvert, est d'environ -73 mV pour HCN1, -92 mV pour HCN2 et -81 mV pour HCN4. Les valeurs de  $V_{1/2}$  reportées dans la littérature diffèrent selon le type cellulaire mais indiquent dans tous les cas une valeur plus négative pour HCN2 que pour HCN4 et HCN1.



**Figure 9 : Propriétés cinétiques des différents isoformes des canaux HCN.**

Haut : courant enregistrés lors d'hyperpolarisations à partir d'un potentiel de maintien de -35 mV sur des cellules HEK-293 exprimant les canaux HCN1 murins, ou les canaux HCN2 ou HCN4 humains. Bas : courbe moyenne d'activation en fonction du potentiel membranaire (Accili et coll., 2002).

Bien que le mécanisme d'activation du canal soit probablement le même, l'efficacité d'action de l'AMPC change selon l'isoforme. HCN1 est l'isoforme le moins sensible à

l'AMPc. Le décalage maximal de la courbe d'activation en présence d'AMPc obtenu avec des enregistrements de patch-clamp en configuration soit cellule-entière soit « *inside-out* » se situe dans les gammes suivantes : 2-6,7 mV pour HCN1 ; 12-15 mV pour HCN2 ; 15,2-23 mV pour HCN4 (Accili et coll., 2002).

Outre leurs propriétés biophysiques différentes et leurs différentes sensibilités à l'AMPc, il semblait important d'évaluer le rôle exact ainsi que l'implication de ces différents isoformes dans l'automatisme des cellules pacemaker. Pour cela, des souris invalidées pour les gènes HCN2 ou HCN4 ont été créées et phénotypées.

Les souris transgéniques invalidées pour le gène HCN2 développent des arythmies cardiaques dues à une dysfonction sinusale (Ludwig et coll., 2003). L'étude électrophysiologique des cellules isolées du nœud sinusal de ces souris révèle une réduction de l'amplitude de  $I_f$  de 30% en comparaison aux animaux sauvages. L'inactivation du gène HCN2 entraîne ainsi un ralentissement des cinétiques d'activation du courant  $I_f$ . Ces observations laissent supposer que l'isoforme HCN2 serait responsable des cinétiques d'activation rapides de  $I_f$  dans les cellules pacemakers du nœud sinusal. Il est cependant intéressant de noter que la variation de la fréquence cardiaque de ces souris déficientes en HCN2, pendant une activité ou une stimulation par injection d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique, n'est pas différente de celle des souris sauvages. Ce résultat indique que l'isoforme HCN2 n'est pas indispensable à la régulation sympathique du rythme cardiaque.

L'inactivation totale du gène HCN4 chez les souris, ainsi que l'inactivation spécifique de HCN4 dans le cœur des souris, provoquent une létalité embryonnaire entre les jours 9,5 et 11 (Stieber et coll., 2003). Dans les cardiomyocytes de ces embryons, le courant de pacemaker  $I_f$  est réduit de près de 80%. De plus, la fréquence cardiaque des embryons est réduite de 40% par rapport à la fréquence des embryons de souris sauvages. De plus, contrairement aux souris sauvages, la fréquence cardiaque n'est pas augmentée par l'addition

d'AMPC, suggérant que l'isoforme HCN4 est responsable de la réponse à la stimulation sympathique, au moins au niveau embryonnaire. Stieber et ses collaborateurs n'ont détecté aucun potentiel pacemaker « mature » chez les embryons déficients en HCN4 alors que ces potentiels sont observés chez les souris sauvages à partir du 9<sup>ème</sup> jour. Ces résultats indiquent donc que HCN4 contribue à la génération du potentiel pacemaker et à la détermination du rythme cardiaque basal.

Pour s'affranchir de la létalité embryonnaire des souris HCN4<sup>-/-</sup> Hermann et ses collaborateurs ont mis au point des animaux déficients pour le gène HCN4, mais de manière contrôlée dans le temps (Hernnan et coll, 2007). La délétion de HCN4 conduit à une diminution de  $I_f$  de plus de 75% au niveau du nœud sinusal. Les conséquences sont de fréquentes pauses sinusales durant lesquelles aucun complexe n'est détectable à l'ECG. Cependant, contrairement aux embryons déficients pour le gène HCN4, ces souris HCN4<sup>-/-</sup> ne perdent pas leur sensibilité au système nerveux autonome. Ces résultats démontrent que le rôle de HCN4 est moins essentiel chez l'adulte que chez l'embryon, au moins chez la souris.

## 1.2 Autres voies de régulation des canaux HCN

Des travaux ont démontré une interaction entre les canaux HCN et la sous-unité  $\beta$  KCNE2 (ou MIRP1, *minK-related protein*), fortement exprimée dans les cellules du nœud sinusal. En effet, la transfection de cette sous-unité dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux a pour conséquence une augmentation de  $I_f$  et une accélération des cinétiques d'activation et de désactivation. L'augmentation de  $I_f$  est uniquement corrélée à une stimulation de l'expression membranaire des canaux HCN puisque la courbe d'activation en

fonction du potentiel de HCN est inchangée en présence de KCNE2 (Yu et coll., 2001 ; Qu et coll., 2004). Une autre protéine membranaire a été décrite, pour sa capacité à réguler les canaux HCN, notamment l'isoforme HCN2. Il s'agit de la protéine à douze domaines transmembranaires, KCR1. La surexpression de cette protéine dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés conduit à une réduction du courant  $I_f$  natif dans ces cellules (Michels et coll., 2008).

D'autres travaux ont révélé que les canaux HCN peuvent être régulés par des phospholipides membranaires tel que le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PI(4,5)P_2$ ) endogène. L'application d'un analogue du  $PI(4,5)P_2$ , le dioctanoyl phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $diC8-PIP_2$ ), décale la courbe d'activation de HCN2 vers des potentiels moins négatifs de manière dose-dépendante dans des cellules isolées du nœud sinusal de lapin (Pian et coll., 2006).  $I_f$  est ainsi augmenté dans des gammes de potentiels physiologiques. Zolles et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré que le rôle des canaux HCN dans l'automatisme nécessite l'interaction avec le  $PI(4,5)P_2$  (Zolles et coll., 2006). Notons que contrairement à la régulation de HCN par l'AMPc pour laquelle les isoformes HCN2 et HCN4 sont plus sensibles que l'isoforme HCN1, la sensibilité au phosphoinositide est similaire pour tous les isoformes.

La régulation de l'activité du canal HCN par la kinase Src a été également démontrée. Src se fixe à l'extrémité C-terminale de la protéine HCN et phosphoryle la tyrosine en position 476. Cette phosphorylation par la kinase Src permet d'accélérer les cinétiques d'activation de  $I_f$  sans altérer sa dépendance au potentiel et contribue donc *in vivo* au contrôle de l'activité du canal HCN (Zong et coll., 2005). Cette interaction entre la kinase Src et le canal HCN révélée dans les cellules HEK293 a ensuite été validé dans des myocytes ventriculaires de rat (Arinsburg et coll., 2006). Mais contrairement au travail de Zong sur l'isoforme HCN2, Arinsburg et ses collaborateurs ont observé un décalage de la dépendance



au potentiel de l'isoforme HCN4 vers des valeurs moins négatives lors de la stimulation de Src dans des cellules HEK293.

## 2. Les courants calciques

### 2.1 Les canaux calciques

Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants sont une des principales voies permettant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules pacemakers. Ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T et de type L sont fortement exprimés dans les cellules automatiques du nœud sinusal et des cellules du nœud AV (Hagiwara et coll., 1988 ; Protas et coll., 2001; Yuill et coll., 2002). De plus ils sont régulés par l'activité du système nerveux autonome que ce soit d'une manière positive ou négative.

La phase initiale de la dépolarisation diastolique est générée par l'activation du courant pacemaker  $I_f$ . L'activation de  $I_f$  permet d'atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type T, Cav3.x. Une forte expression des transcrits de Cav3.1 et une expression plus faible des transcrits de Cav3.2 ont été observées dans le nœud sinusal de la souris, alors que les transcrits de Cav3.3 n'ont pas été détectés (Bohn et coll., 2000 ; Mangoni et coll., 2003 ; Niwa et coll., 2004). L'abolition de  $I_{\text{Ca,T}}$  et la bradycardie sinusale des souris Cav3.1<sup>-/-</sup> indiquent la participation de la sous-unité Cav3.1 dans la genèse de  $I_{\text{Ca,T}}$  (Mangoni et coll., 2006).

Le courant calcique de type L,  $I_{\text{Ca,L}}$ , généré par les canaux Cav1.x, s'active plus tardivement pour des potentiels compris entre -50 et -30 mV. L'étude de souris transgéniques invalidées pour les gènes codant les canaux Cav1.2 et Cav1.3 a permis de démontrer leur rôle essentiel dans l'activité pacemaker *in vivo* et *in vitro* des cardiomyocytes (Zhang et coll., 2002

; Mangoni et coll., 2003). Bien que l'expression de ses transcrits ait été détectée à un plus faible niveau par rapport à Cav1.2, la contribution de Cav1.3 dans l'automatisme cardiaque semble majeure. En effet, les souris Cav1.3<sup>-/-</sup> présentent une dysfonction sinusale majeure, associée à une bradycardie sévère et des arythmies sino-atriales. Il faut noter que l'expression de Cav1.3 est limitée au nœud sinusal, au nœud auriculo-ventriculaire et aux oreillettes, et génère par conséquent le courant I<sub>Ca,L</sub> impliqué dans l'automatisme. Dans les cellules du nœud sinusal, ce courant est régulé par la PKA (Petit-jacques et coll., 1993) et par l'activation de la protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante de type II (CaMKII) qui régulent les cinétiques d'activation et de réactivation des canaux générant le courant I<sub>Ca,L</sub> (Vinogradova et coll., 2000 et 2002).

Globalement, ces études suggèrent donc que I<sub>Ca,T</sub>, via la sous-unité Cav3.1, contribue à la phase précoce de la dépolarisation diastolique pendant que I<sub>Ca,L</sub>, via la sous-unité Cav1.3, est impliqué dans la phase terminale de la dépolarisation diastolique. La sous-unité Cav1.2, activée à des potentiels plus dépolarisés (Koschak et coll., 2001), contribuerait quant à elle à la phase terminale de la dépolarisation diastolique et à la dépolarisation du potentiel d'action.

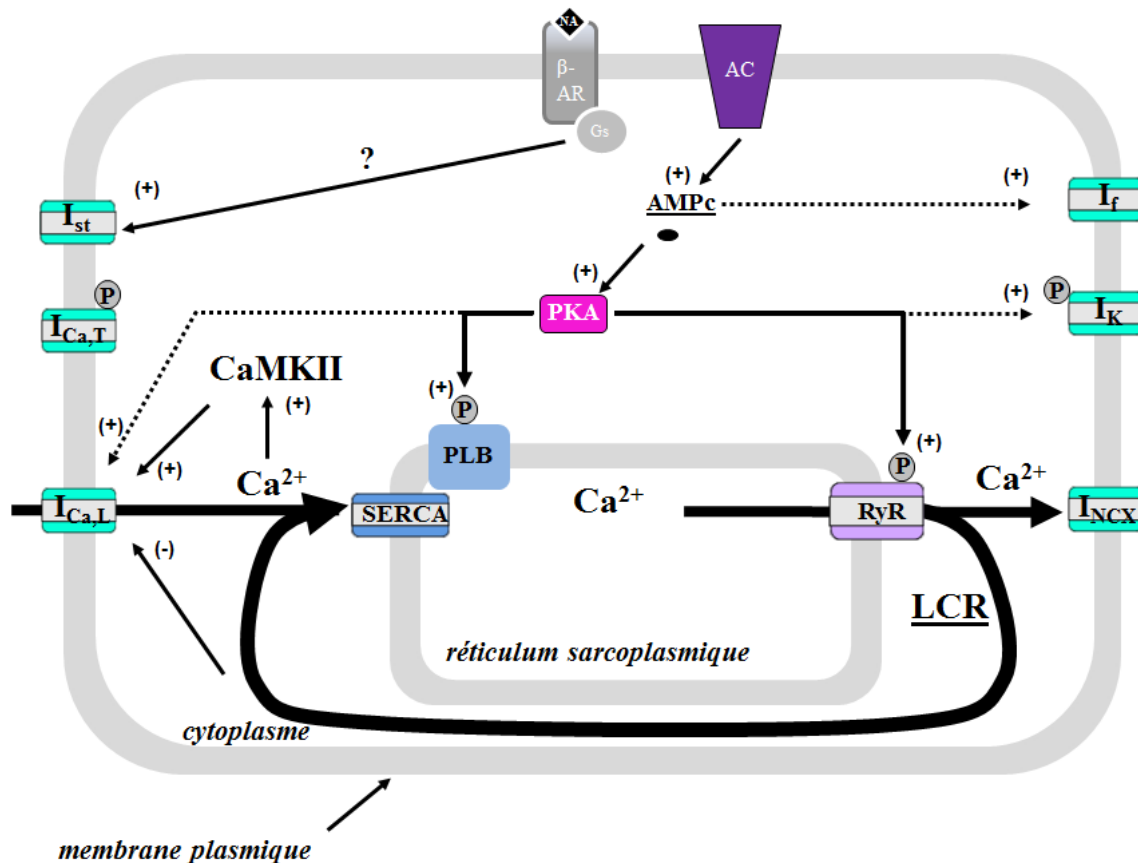
## 2.2 Le calcium intracellulaire

Il a été montré que dans les cellules sinusales automatiques, la libération locale de Ca<sup>2+</sup> par le réticulum sarcoplasmique via les récepteurs à la ryanodine (RyR) déclenchée par les canaux calciques de type T stimule le courant entrant dépolarisant de l'échangeur sodium-calcium, I<sub>NCX</sub>, et contribue ainsi à l'automatisme des cellules du nœud sinusal (Huser et coll., 2000 ; Bogdanov et coll., 2001). En effet le blocage de la libération du Ca<sup>2+</sup> avec de la ryanodyne, ou I<sub>NCX</sub> en substituant le sodium par du lithium, conduit à une abolition complète de l'activité pacemaker de ces cellules.

De plus Vinogradova et ses collaborateurs ont démontré que la libération locale et cyclique de  $\text{Ca}^{2+}$  ne nécessite pas la dépolarisation de la membrane plasmique et que sa périodicité est corrélée au rythme de l'activité pacemaker des cellules du nœud sinusal (Vinogradova et coll. 2004). Durant les battements spontanés des cellules pacemaker, l'oscillation rythmique et spontanée calcique est stoppée par l'apparition du potentiel d'action qui conduit à l'activation du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  pour libérer le calcium du réticulum sarcoplasmique et inhiber les RyR. Durant la dépolarisation diastolique, lorsque les pompes calciques (SERCA) permettent de reconstituer le stock calcique et de lever l'inhibition des RyR, la libération spontanée du  $\text{Ca}^{2+}$  via les RyR peut à nouveau être déclenchée. Cette augmentation sous-membranaire locale du calcium va ainsi générer un courant dépolarisant via l'activation de l'échangeur sodium-calcium. Il augmente ainsi la pente de dépolarisation diastolique et permet donc le déclenchement du potentiel d'action suivant (Vinogradova et coll., 2005).

Dans les cellules du nœud sinusal,  $I_{\text{NCX}}$ , tout comme  $I_f$ , est régulé par la stimulation sympathique (figure 10). La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques augmente le taux d'AMPc ce qui conduit à une activation de la PKA. Cette protéine est responsable de la phosphorylation du phospholamban (PLB), une sous-unité régulatrice de la pompe calcique SERCA2, responsable du stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique et de la phosphorylation des RyR, impliqués dans la libération locale de  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi que de l'influx calcique au travers des canaux calciques  $I_{\text{Ca,L}}$ . La libération locale de  $\text{Ca}^{2+}$  (LCR) à partir du réticulum sarcoplasmique est liée à la dépolarisation diastolique via l'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  du courant entrant  $I_{\text{NCX}}$ . De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire permet d'activer la protéine kinases  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline dépendante II (CaMKII) qui va également favoriser l'influx calcique via les canaux calciques  $I_{\text{Ca,L}}$  (Lakatta et coll., 2010). L'AMPc, de manière directe ou via l'activation de la PKA, régule les potentiels d'action spontanés (Maltsev et coll., 2006).

Le cycle calcique via les pompes calciques du réticulum sarcoplasmique, les RyR et le courant  $I_{NCX}$ , ainsi que sa modulation par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, représente un mécanisme majeur de régulation de l'activité spontanée cardiaque (Bogdanov et coll., 2006 ; Gao et coll., 2010).



**Figure 10 : Contrôle de l'automatisme des cellules du nœud sinusal par le cycle calcique spontané.**

AC, adénylate cyclase ;  $\beta$ -AR, récepteur  $\beta$ -adrénergique ;  $G_s$ , sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (sous-unité stimulatrice de l'AC) ; LCR : La libération locale de  $Ca^{2+}$  ; PKA, Protéine Kinase A ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RYR : récepteurs à la ryanodine ; PLB phospholamban ; flèche noire épaisse : le cycle calcique spontané. D'après Maltsev et coll., 2006.

Le cycle calcique spontané, au même titre que l'activation de  $I_f$ , est donc l'un des mécanismes moléculaires majeurs de l'automatisme cardiaque. Les travaux de Bucchi et de ses collaborateurs ont démontré que l'initiation de la dépolarisation diastolique correspond à l'activation de  $I_f$ .  $I_f$  est la cible principale de la régulation par le système nerveux de la fréquence cardiaque via une modulation de la pente de dépolarisation diastolique. Le second

mécanisme impliquant la libération transitoire du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique intervient dans la phase tardive de la diastole et détermine le seuil de déclenchement du potentiel d'action (Bucchi et coll., 2007).

### 3. Les courants sodiques

Les cellules pacemakers sont caractérisées par une vitesse très lente de la phase ascendante des potentiels d'action, ce qui suppose que cette phase est principalement due à l'activation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  plutôt qu'à l'ouverture des canaux  $\text{Na}^+$ , contrairement aux cellules myocardiques non automatiques. On pourrait donc conclure que le courant sodique rapide  $I_{\text{Na}}$  n'y joue pas de rôle majeur dans l'automatisme. Cependant, certains canaux sodiques ont été décrits comme participant à l'activité automatique de cellules du nœud sinusal, au moins chez la souris (Lei et coll., 2005). Deux types de courants différents ont été ainsi identifiés, l'un sensible à la tétrodotoxine (TTX-sensible) généré par le canal Nav1.1 (Baruscotti et coll., 1996 Baruscotti et coll., 1997 ; Lei et coll., 2004), et l'autre insensible à la tétrodotoxine (TTX-résistant) et porté par le canal Nav1.5 (Lei et coll., 2004 ; Lei et coll., 2005).

Le courant TTX-sensible est présent dans le centre et la périphérie du nœud sinusal et participe à la phase de dépolarisation diastolique (Baruscotti et coll., 1996). Le courant TTX-résistant s'exprime en périphérie uniquement bien qu'il semble exister un gradient de densité croissant du centre vers la périphérie. Il participerait à la phase de dépolarisation diastolique mais son importance est encore mal connue. Sa présence est en revanche indispensable à l'activité de conduction au sein du nœud sinusal (Lei et coll., 2005). En effet les caractéristiques phénotypiques des souris  $\text{Scn5a}^{+/-}$  montrent non seulement un ralentissement

de l'activité automatique, mais aussi le ralentissement de la conduction au sein du nœud sinusal ainsi que la formation d'un bloc de sortie (Papadatos et coll., 2002 ; Lei et coll., 2005).

Un autre courant sodique a également été identifié au niveau sinusal : le courant sodique entrant soutenu  $I_{st}$ . Mis en évidence pour la première fois en 1995 (Gual et coll., 1995), il est exprimé au niveau des cellules du nœud sinusal chez le cobaye, le rat et la souris (Cho et coll., 2003 ; Shinagawa et coll., 2007). Chez le lapin, ce courant est également présent au niveau du nœud AV (Gual et coll., 1997). Mitsuye et ses collaborateurs ont d'ailleurs décrit que l'expression de  $I_{st}$  est restreinte uniquement au niveau des cellules automatiques du nœud sinusal et du nœud AV (Mitsuye et coll., 1999).  $I_{st}$  est activé pendant la phase de dépolarisation diastolique des cellules du nœud sinusal. Ce courant partage des propriétés communes avec les courants calciques de type L puisqu'il est bloqué par des antagonistes de ces courants (vérapamil, D 600, nicardipine,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ). Il est résistant à la tétrodotoxine et il est accru par le Bay K 8644 (un agoniste calcique).

Ce courant est régulé par les récepteurs  $\beta$ -adrénergique. L'augmentation du taux d'AMPc stimule le courant  $I_{st}$  via une phosphorylation par la PKA (DiFrancesco et Mangoni, 1994 ; Mitsuiye et coll., 2000 ; Mangoni et coll., 2003). Au contraire, la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses parasympathiques induit une stimulation des récepteurs muscariniques M2 couplés à une protéine  $G_i$  qui réduit l'activité de l'adénylate cyclase, entraînant une diminution du taux cytoplasmique de l'AMPc (Hartzell, 1988). Cette baisse a pour conséquence une déphosphorylation des canaux calciques  $I_{Ca,L}$  (Petit-Jacques et coll., 1993) et des canaux responsables du courant  $I_{st}$  (Guo et coll., 1997).

Les mécanismes moléculaires de  $I_{st}$  sont encore peu connus, ce qui rend difficile l'étude du rôle direct de ce courant dans l'automatisme. Shinagawa et ses collaborateurs ont proposé, grâce à un modèle mathématique, que ce courant participe au contrôle de la fréquence des dépolarisations diastoliques des cellules du nœud sinusal de rat (Shinagawa et

coll., 2007) et qu'en raison de ses propriétés biophysiques (faible seuil d'activation et inactivation lente) il puisse prendre part à toutes les phases du potentiel d'action des cellules pacemaker. D'autres modèles mathématiques permettent d'apporter quelques renseignements supplémentaires quant au rôle de  $I_{st}$  dans l'automatisme : Zhang et ses collaborateurs ont montré qu'il pouvait avoir un rôle variable selon la région du nœud sinusal. Dans les cellules périphériques, ce courant n'affecterait pas l'activité automatique. En revanche, au niveau des cellules centrales du nœud sinusal, ce courant jouerait un rôle important dans l'automatisme (Zhang et coll., 2000 ; Zhang et coll., 2002).

#### 4. Les courants potassiques

Plusieurs courants potassiques voltage-dépendants participent à la phase de la repolarisation des cellules automatiques. Au sein du nœud sinusal et du nœud AV, trois types de courants potassiques ont été identifiés :  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  et  $I_{to}$ .

Le courant potassique à rectification retardée joue un rôle dans la repolarisation et module le potentiel diastolique après chaque potentiel d'action. Ce courant potassique présente deux composantes distinctes avec des propriétés biophysiques différentes : une à activation dite rapide,  $I_{Kr}$ , généré par le canal ERG1, et l'autre à activation lente,  $I_{Ks}$ , généré par le canal KvLQT1, régulé par KCNE1.  $I_{Kr}$  est responsable de la repolarisation des potentiels d'actions automatiques. Lorsqu'il est bloqué par un inhibiteur spécifique, l'E-4031, l'activité spontanée est ralentie et des pauses sinusales se produisent dans les cellules du nœud sinusal de rat ou de cobaye (Shinagawa et coll., 2000 ; Matsuura et coll., 2002).

$I_{Ks}$  semble également jouer un rôle dans la repolarisation des potentiels d'action, mais l'importance de sa contribution dans l'automatisme est variable selon les espèces. Dans les

cellules nodales de porc,  $I_{Ks}$  est la composante majoritaire du courant potassique à rectification retardé par rapport au courant  $I_{Kr}$ . Le blocage d' $I_{Ks}$  par son inhibiteur spécifique, le chromanol 293B, induit une diminution significative de la fréquence des potentiels d'action spontanés de ces cellules (Ono et coll., 2000). Au contraire,  $I_{Kr}$  est majoritaire dans les cellules nodales du cœur de lapin et des rongeurs. L'inhibition d' $I_{Ks}$  semble avoir un effet sur l'automatisme des cellules du nœud sinusal issues des cœurs de cobaye et de lapin. Cependant, le courant  $I_{Kr}$  est capable de conduire l'automatisme de ces cellules malgré le blocage du courant  $I_{Ks}$  (Matsuura et coll., 2002 ; Lei et coll., 2002).

Outre les courants potassiques retardés qui contribuent donc à la repolarisation tardive du potentiel d'action spontané, il a été mis en évidence un courant transitoire sortant  $I_{to}$ , responsable de la première phase rapide de repolarisation.  $I_{to}$  est décrit comme étant sensible à la 4-aminopyridine (4-AP). Ce courant est présent de façon hétérogène dans les cellules du nœud sinusal de lapin (Boyett et coll., 1998 ; Honjo et coll., 1999 ; Lei et coll., 2000). En effet l'activité automatique des cellules périphériques du nœud sinusal de lapin est plus sensible à l'inhibition de  $I_{to}$  par la 4-AP par rapport aux cellules centrales (Boyett et coll., 1998, Honjo et coll., 1999). Ce blocage conduit ainsi au ralentissement de la première phase de la repolarisation et donc à un allongement des potentiels d'action spontanés. Cette variation de la densité d' $I_{to}$  dans les cellules périphériques par rapport aux cellules centrales du nœud sinusal est responsable du gradient de durée des potentiels d'action du centre vers la périphérie du nœud sinusal et aurait un rôle protecteur contre les arythmies, en empêchant ainsi une réexcitation du nœud sinusal par des influx d'origine auriculaire.

D'autres courants potassiques ont été décrits comme participant à l'automatisme cardiaque. C'est le cas du courant  $K^+$  activé par l'acétylcholine ( $I_{K,ACH}$ ). Ce courant est généré par les canaux Kir3.1-Kir3.4 exprimés dans le nœud sinusal, au niveau auriculaire et dans le nœud AV (DiFrancesco et coll., 1989 ; Giles et coll., 1979 ; Noma et coll., 1978). Le courant



$I_{K,ACH}$  résultant de la tétramérisation de ces deux canaux est activé par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques et des récepteurs à l'adénosine grâce à une liaison directe de la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G (Wickman et coll., 1995 et Wickman et coll., 1999). Cette activation a pour conséquence une hyperpolarisation membranaire soutenue des cellules du nœud sinusal (Mark et Herlitz, 2000) conduisant à un ralentissement voire même à un blocage de leur activité rythmique.

Des canaux potassiques sensibles aux taux intracellulaires d'ATP ont été mis en évidence dans les cellules sinusales de lapin (Han et coll., 1996). Ces canaux s'activent lors d'une baisse du taux d'ATP intracellulaire. Le courant  $I_{K,ATP}$  qui en résulte conduit à une hyperpolarisation des cellules sinusales et ralentit ainsi leur activité automatique (Han et coll., 1996).

Contrairement aux cardiomyocytes contractiles et aux cellules de His-Purkinje, les cellules automatiques du nœud sinusal ne présentent pas de courant  $I_{K1}$ . Ce courant potassique, généré par les canaux Kir2.1 et Kir2.2 dans le cœur, est responsable du maintien du potentiel de repos des cellules. Cependant, une faible densité de  $I_{K1}$  a été retrouvée dans les cellules sinusales et du nœud AV de lapin (Brown et coll., 1980 ; Nakayama et coll., 1984 ; Noma et coll., 1984), mais également dans certaines cellules pacemaker du nœud sinusal de rat (Shinagawa et coll., 1994) et de souris (Cho et coll., 2003). L'absence de ce courant ou sa faible amplitude explique le faible potentiel membranaire et la forte résistance membranaire, nécessaires au déclenchement des potentiels d'action spontanés.

## 5. Les courants chlorures

Plusieurs types de courant chlorures ont été décrits comme participant à l'automatisme cardiaque.

L'un d'eux est le courant chlorure activé par le calcium intracellulaire. Ce courant transitoire  $I_{Cl(Ca)}$ , voltage-indépendant, est activé par la libération des ions calcium en dehors du réticulum sarcoplasmique, via les RyR. Verkerk et ses collaborateurs ont démontré que dans les cellules sinusales de lapin,  $I_{Cl(Ca)}$  n'est actif qu'à la fin de la phase de dépolarisation systolique et au début de la phase de repolarisation.  $I_{Cl(Ca)}$  joue un rôle dans la modulation du pic du potentiel d'action (Verkerk et coll., 2002).

D'autre part, Bescond et ses collaborateurs ont démontré que dans les cellules du nœud sinusal de lapin, l'angiotensine II, en se fixant sur des récepteurs transmembranaires AT1, était capable d'activer un courant chlorure,  $I_{Cl}$ , sensible à la Protéine Kinase C et au calcium intracellulaire (Bescond et coll, 1994). Ce courant de nature sortante dans les gammes de potentiels de la phase de dépolarisation diastolique, entraîne ainsi une dépolarisation du potentiel membranaire, conduisant à un effet chronotrope positif.

Un autre courant chlorure activé cette fois-ci par une variation du volume cellulaire a également été décrit. D'après les expériences d'Hagiwara et ses collaborateurs, ce courant, souvent annoté  $I_{Cl,swell}$ , représente l'une des composantes du courant de fond des cellules sino-atriales de Lapin (Hagiwara et coll., 1992).

## **B. LES PATHOLOGIES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE**

### **I. Les dysfonctions sinusales**

Dans certaines pathologies l'activité du nœud sinusal peut être anormale par sa fréquence trop élevée (tachycardie sinusale) ou au contraire trop lente (bradycardie sinusale), ou bien encore par son irrégularité. Lorsque ces épisodes sont observés, on parle de dysfonction sinusale (Stieber et coll., 2004). Dans des cas plus graves, l'activité du nœud sinusal peut même cesser (arrêt sinusal), laissant la place à un autre centre de commande (pacemaker secondaire) qui va donc prendre le relais de l'automatisme sinusal. Parmi ces centres secondaires, il faut distinguer, d'une part, les centres supraventriculaires (myocarde auriculaire, nœud auriculo-ventriculaire, tronc commun du faisceau de His) n'entraînant pas de modification sur l'activation de la masse ventriculaire et donnant un aspect normal du complexe QRS et, d'autre part, les centres de commande ventriculaires siégeant au-dessous de la bifurcation du faisceau de His qui entraînent une activation anormale de la masse ventriculaire se traduisant par un QRS large.

Le « *sick sinus syndrome* » est une pathologie caractérisée par un ensemble de symptômes tels que des étourdissements, une fatigue et des syncopes causés par une dysfonction du nœud sinusal. C'est une pathologie cardiaque commune, à l'origine de près de 50% des implantations de stimulateurs électroniques (Lamas et coll., 2002). Les manifestations cliniques de cette pathologie sont une bradycardie sinusale, un arrêt sinusal, un bloc de sortie, une alternance de périodes de bradycardie et de tachycardie (Mangrum et DiMarco, 2000).

Dans la majorité des cas, la pathologie est due à une dégénérescence idiopathique du nœud sinusal ou peut être secondaire à l'utilisation d'agents pharmacologiques. Mais elle peut

aussi résulter d'anomalies génétiques. A ce jour, plusieurs mutations ont été décrites. Schulze-Bahr et ses collaborateurs ont découvert une mutation hétérozygote de HCN4 (hHCN4-573X) chez un patient atteint de bradycardie sinusale idiopathique et d'incompétence chronotrope, c'est-à-dire d'absence d'accélération de la fréquence cardiaque (Schulze-Bahr et coll., 2003). Cette mutation s'est révélée être à l'origine d'une protéine HCN4 tronquée au niveau de son site CNBD, conduisant à l'impossibilité d'une régulation par l'AMPc. Cette protéine mutante se caractérise par une accélération des cinétiques de désactivation du canal, responsable d'une diminution de la disponibilité des canaux HCN4 et à l'origine de la bradycardie sinusale. Une autre mutation de type non-sens, hHCN4-D553N a été découverte chez 25 patients atteints de dysfonction sinusale, Cette mutation est localisée au niveau de la partie COOH terminale ce qui a pour conséquence une altération de l'adressage du canal à la membrane. Les patients portant cette mutation présentent des bradycardies sinusales sévères, de longues pauses sinusales suivies d'épisodes de tachycardie ventriculaire (Ueda et coll., 2004). La mutation hHCN4-S672R a également été identifiée par Milanesi et ses collaborateurs en 2006 chez une famille italienne. Cette mutation se localise sur le site de fixation des nucléotides cycliques, modifie les effets de l'AMPc intracellulaire et provoque une bradycardie sinusale asymptomatique (Milanesi et coll., 2006). Une quatrième mutation du canal HCN4 (G480R) a été localisée dans la séquence GYG ; cette mutation se traduit par un décalage de la courbe d'activation du canal HCN4 vers des potentiels membranaires plus négatifs et un défaut de synthèse et de trafic de la protéine (Nof et coll., 2007). Enfin une dernière mutation a été récemment découverte hHCN4-A485V. Elle est localisée également au niveau de la séquence GYG affectant ainsi le filtre de sélectivité du canal. Cette mutation induit une diminution de l'expression du canal et un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels moins négatifs. Les patients portant cette mutation sont

symptomatiques à différents degrés pouvant aller de simples étourdissements à des épisodes présyncopaux (Laish-Farkash et coll., 2010).

## **II. Les troubles de la conduction**

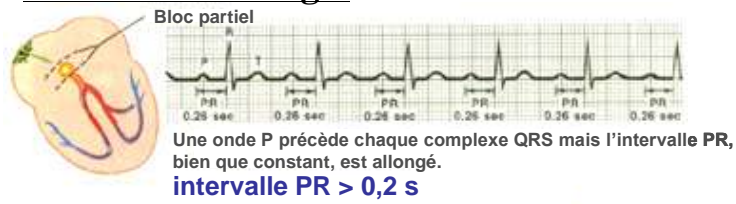
Un grand nombre de pathologies cardiaques induisent des troubles de la conduction. La cause la plus fréquemment observée est une dégénérescence idiopathique des voies de conduction comme initialement décrit par Lenègre (Lenègre et Moreau, 1963) et Lev (Lev, 1964). Cette dégénérescence est responsable, selon les études, de 33 à 69% des blocs auriculo-ventriculaires chroniques (Hejtmancik et coll., 1956 ; Davies, 1976). Les autres pathologies fréquentes comprennent l'ischémie myocardique, les calcifications dues aux valvulopathies aortiques ou mitrales et les diverses autres cardiomyopathies. A des degrés moindres, des cas de tumeurs, de cardiomyopathies congénitales, de maladies du collagène et d'atteintes traumatiques ou chirurgicales sont également recensés (Benson, 2004).

De nos jours, la fréquence des causes ischémiques en cas d'infarctus antérieur massif du myocarde a nettement diminué en comparaison de la fréquence observée dans l'étude de Davies (Davies, 1976). Ceci est corrélé à l'utilisation intensive des moyens de reperfusion pendant la phase aiguë de l'infarctus. Au contraire, l'augmentation du nombre de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque pourrait rendre compte de l'augmentation des blocs auriculo-ventriculaires postopératoires. De la même manière, l'augmentation du nombre de blocs auriculo-ventriculaires dégénératifs, qui touchent préférentiellement les personnes âgées, est très certainement due au vieillissement de la population.

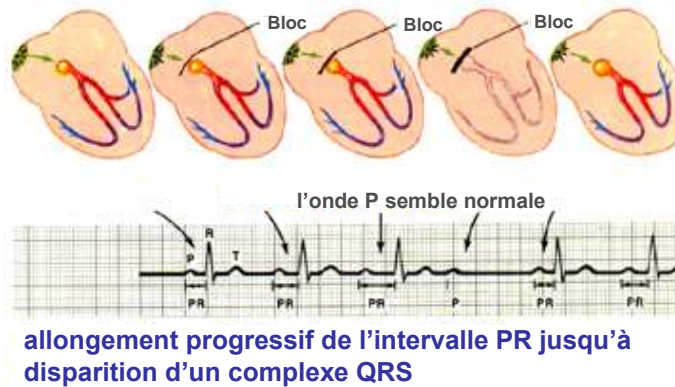
Le bloc auriculo-ventriculaire (bloc AV) peut être de degré variable allant d'un simple ralentissement de la conduction jusqu'à son interruption complète. Il existe trois niveaux différents selon une gravité croissante (figure 11) :

- le bloc du premier degré (bloc AV I). Toutes les impulsions atriales sont conduites aux ventricules mais avec un délai retardé. La durée de la conduction auriculo-ventriculaire, reflétée par l'intervalle PR, est ainsi allongée.
- Le bloc du deuxième degré (bloc AV II). Tous les influx auriculaires, un ou plusieurs influx, ne sont pas conduits jusqu'aux ventricules. Les blocs AV II sont divisés en deux groupes : les blocs AV II de type Mobitz I caractérisés par un allongement progressif de l'intervalle PR qui aboutit au blocage de l'onde P et les blocs AV II de type Mobitz II où certaines ondes P ne sont pas conduites jusqu'aux ventricules mais sans allongement au préalable de la conduction. Un bloc AV II de type Mobitz I est dû à une atteinte au niveau du nœud AV alors que celui de type Mobitz II a plutôt une origine infra-nodale, le plus souvent au niveau des branches ou du tronc du faisceau de His.
- Le bloc du troisième degré (bloc AV III). Aucun influx atrial n'est conduit jusqu'aux ventricules. Le faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje qui constituent autant de zones potentielles de foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement prennent alors le relais. Le foyer émergeant dans l'un ou l'autre de ces tissus sert alors de foyer d'automatisme secondaire comme peuvent l'être les cellules du nœud AV. En revanche, cet automatisme secondaire se caractérise par un rythme trop lent pour assurer une activité cardiaque normale suffisante.

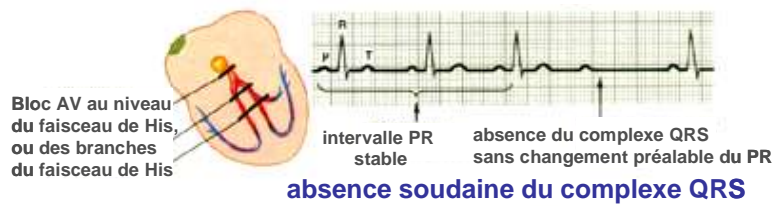
### Bloc AV du 1<sup>er</sup> degré



### Bloc AV du 2<sup>nd</sup> degré, type Mobitz I



### Bloc AV du 2<sup>nd</sup> degré, type Mobitz II



### Bloc AV du 3<sup>ème</sup> degré

oreillettes et ventricules sont dépolarisés indépendamment

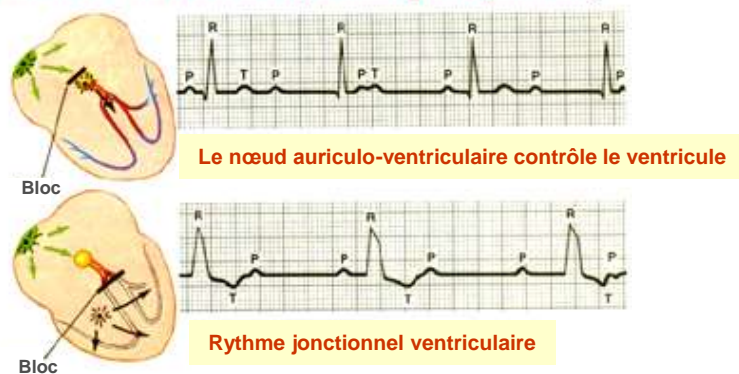


Figure 11 : Classification clinique des troubles de la conduction auriculo ventriculaire.  
<http://www.unm.edu/~lkravitz/EKG/avblocks.html>

La localisation du bloc auriculo-ventriculaire est définie en fonction de sa localisation par rapport au niveau du faisceau de His. Les blocs suprahissiens se situent en amont du tronc commun et sont en général dus à une atteinte du nœud AV. Les blocs infrahissiens correspondent à des lésions localisées sur le faisceau de His. Ces blocs infrahissiens relèvent d'une atteinte bilatérale des voies de conduction intraventriculaire. Il est généralement considéré que le bloc est d'autant plus grave qu'il est situé plus bas.

Tout comme la dysfonction sinusale, le bloc AV, nécessite l'implantation d'un stimulateur électronique cardiaque. C'est une méthode lourde et seulement palliative pour les patients mais jusqu'à maintenant irremplaçable car elle permet de rétablir la conduction lorsque celle-ci ne se fait plus.

### **C. LE PACEMAKER BIO-ARTIFICIEL**

A l'heure actuelle la seule thérapie proposée, en cas de pathologie de la conduction cardiaque est l'implantation d'un stimulateur électronique cardiaque. Plus de 600 000 stimulateurs électroniques sont implantés annuellement dans le monde. Bien qu'il permette d'allonger considérablement la durée de vie des patients, le pacemaker électronique n'est aujourd'hui qu'un traitement palliatif et non curatif qui comporte un certain nombre d'inconvénients. Les complications les plus courantes sont des infections, des embolies, des dysfonctions mécaniques, lesquelles impliqueront, tout comme la fin de vie de la batterie (10 à 12 ans), le remplacement d'une partie ou de la totalité de l'appareillage.

C'est donc pour ces raisons que l'idée de mettre au point un pacemaker bio-artificiel, lequel devra compléter ou remplacer le pacemaker électronique, a émergé. D'une part, la compréhension des mécanismes cellulaires de l'automatisme du pacemaker physiologique a



suffisamment progressé pour permettre plusieurs hypothèses d'expérimentations. D'autre part, les techniques de thérapie génique et de thérapie cellulaire ont fortement progressé.

## **I. L'approche cellulaire**

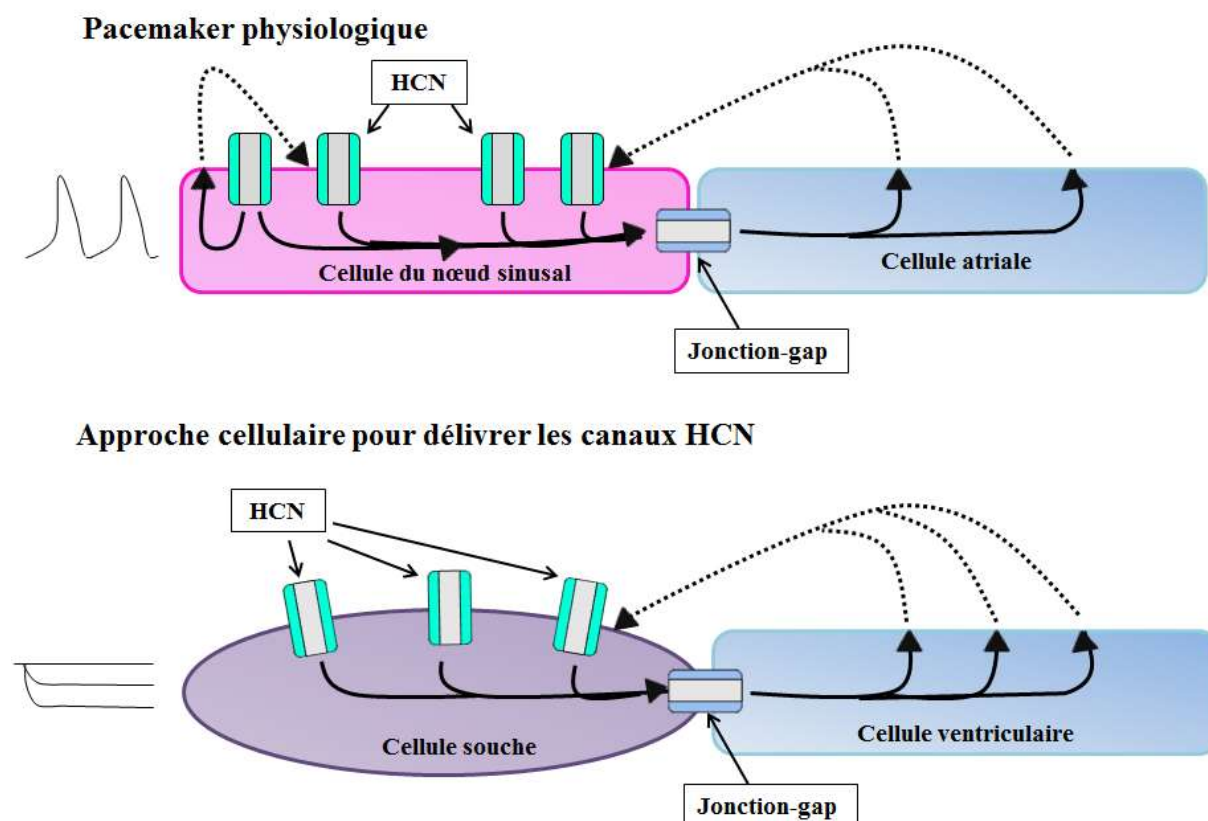
Une des approches pour la création du pacemaker bio-artificiel a longtemps été la thérapie cellulaire. Plusieurs types de cellules ont donc été employés dont les cellules souches embryonnaires et les cellules souches mésenchymateuses d'adulte.

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui possèdent le potentiel de se différencier en de nombreux types cellulaires de l'organisme. Ces cellules, placées dans un environnement moléculaire précis, sont capables de se différencier en cardiomyocytes. La stratégie utilisée a été de différencier ces cellules en une lignée cellulaire possédant les caractéristiques de cellules pacemaker et ensuite de les intégrer dans le tissu cardiaque, avec l'hypothèse que ces cellules seraient ainsi capables de délivrer une activité pacemaker. Une étude réalisée dans un modèle de porc en bloc auriculo-ventriculaire complet a montré que l'implantation de cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires au niveau du ventricule permettait de créer un pacemaker bio-artificiel. Des expériences de cartographie ont révélé que l'activité pacemaker était originaire du site d'implantation (Kehat et coll., 2004). Ces cellules ont ainsi été capables de se coupler aux cellules avoisinantes et de s'intégrer efficacement au sein du syncytium cardiaque. Cette intégration mécanique et électrique avec les cellules ventriculaires hôtes fut confirmée dans un modèle de cobaye où des enregistrements des potentiels d'action spontanés ont été obtenus dans le ventricule gauche de ces cobayes à l'endroit même du site d'implantation de ces cellules (Xue et coll., 2005).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines adultes ont également été utilisées pour la création de pacemakers bio-artificiels. Même si elles restent avant tout un des principaux outils de l'approche cellulaire, ces cellules servent de plateforme pour la thérapie génique. Des analyses préliminaires ont révélé que ces cellules souches mésenchymateuses humaines n'expriment pas les gènes *Hcn2* et *Hcn4*. En revanche, elles expriment *KCNQ1* (le gène codant pour la sous-unité  $\alpha$  du canal portant  $I_{Ks}$ ) et la connexine 43 (Heubach et coll., 2004). Les cellules souches mésenchymateuses humaines implantées ont été initialement transfectées avec le gène *Hcn2*. Ces cellules ne possèdent pas tous les canaux nécessaires à l'initiation d'un potentiel d'action. Le couplage avec les myocytes du site d'implantation est donc nécessaire pour le déclenchement d'un potentiel d'action. Cette approche repose sur l'hypothèse que le potentiel membranaire élevé des myocytes initie l'ouverture des canaux HCN présents dans les cellules souches, ce qui permet l'établissement d'un potentiel de pacemaker. Cette action pourrait ainsi générer un courant des cellules souches vers les myocytes qui seront à leur tour dépolarisés. Et lorsque le potentiel membranaire des myocytes atteint le potentiel seuil, un potentiel d'action est déclenché (figure 12).

Des études *in vivo* ont été réalisées et un rythme d'échappement a été localisé au niveau du site d'implantation. L'injection dans la paroi ventriculaire gauche de chien de cellules souches mésenchymateuses préalablement transfectées avec le gène *Hcn2* a ainsi permis de générer un rythme d'échappement. Ce rythme idioventriculaire fonctionnait à un rythme d'approximativement 60 battements par minute (BPM) contre 45 BPM pour le foyer d'échappement des animaux contrôles (Potapova et coll., 2004). Dans cette étude, les cellules souches mésenchymateuses ont été transfectées grâce à une électroporation. L'expression du transgène *Hcn2* ne peut donc être que transitoire. Des études utilisant cette fois-ci des cellules souches mésenchymateuses de lapin ont été réalisées. Les auteurs ont infecté ces cellules avec le gène *Hcn2* ou le gène *Hcn4* grâce à un lentivirus. Ces lentivirus sont capables d'intégrer le

transgène dans le génome de l'hôte. Bien que n'ayant pas vérifié l'expression à long terme du transgène, les auteurs ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses, transfectées avec Hcn2 par un lentivirus, peuvent être modifiées pour devenir des cellules pacemakers (Zhou et coll., 2007 ; Yang et coll., 2008).



**Figure 12 : Schéma illustrant l'approche cellulaire pour délivrer les canaux pacemaker HCN.**

Haut : Cellule pacemaker couplée à une cellule voisine (cellules atriales). Bas : Cellule souche mésenchymateuse préalablement transfectée avec le gène Hcn. Le but est de délivrer les canaux HCN aux cellules ventriculaires. Les cellules souches mésenchymateuses, sur-exprimant HCN, sont capables de se coupler via les jonctions *gap* aux cellules ventriculaires. D'après Rosen et coll., 2004.

Toujours dans le cadre de l'approche cellulaire, d'autres auteurs se sont intéressés à d'autres types cellulaires, tels que les cardiomyocytes néonataux. Il a été démontré que ces cellules transplantées pouvaient s'intégrer morphologiquement et se synchroniser électriquement avec le myocarde hôte (Rubart et coll., 2003). Suite à ces données, Ruhparwar

et ses collaborateurs ont démontré la faisabilité de générer un pacemaker bio-artificiel via l'implantation, dans le cœur de chien, de cardiomyocytes auriculaires fœtaux, incluant des cellules du nœud sinusal, avec un rythme intrinsèque rapide (Ruhparwar et coll., 2002). De la même manière, des xénotransplantations ont été réalisées lors de la greffe de cardiomyocytes fœtaux ou néonataux humains chez des porcs en bloc AV. Suite à l'ablation du nœud AV trois à quatre semaines après l'implantation, le rythme d'échappement qui émerge du lieu d'implantation, de l'ordre de 89 BPM contre 30 BPM chez les porcs contrôles, est accéléré de manière significative lors d'une stimulation par un agoniste  $\beta$ -adrénergique, l'isoprénaline (Lin et coll., 2005).

Ces études démontrent donc que les cardiomyocytes auriculaires néonataux sont capables de survivre et de s'intégrer dans le myocarde hôte et de générer une fonction pacemaker sensible à la stimulation adrénergique. Malgré tout, persiste un doute quant à la survie des cellules et l'expression de leur fonction à long terme au sein d'un cœur malade après traitement par des immunosuppresseurs.

Enfin, une autre alternative a été proposée en tentant de convertir des cardiomyocytes ventriculaires en cellules pacemaker par une fusion cellulaire somatique (Cho et coll., 2007). Grâce au polyéthylène glycol 1500, un agent fusionnel (Lentz et Lee, 1999), des fibroblastes de poumon de cobaye exprimant le gène HCN1 ont été fusionnés avec des myocytes ventriculaires isolés de la même espèce. Les hétérocaryons ainsi formés exhibent un automatisme intrinsèque augmenté par une stimulation  $\beta$ -adrénergique. En revanche, initialement envisagée pour répondre aux inconvénients de l'utilisation des cellules souches que sont leur migration et leur prolifération une fois injectées dans le tissu (Cao et coll., 2006), cette étude n'a pas démontré l'émergence d'un foyer d'automatisme après injection des hétérocaryons dans l'apex de cœur de cobaye.

Ces approches donnent des résultats très prometteurs, cependant elles se concentrent seulement sur le fait de générer une activité spontanée qui est d'ailleurs nécessaire mais non suffisante pour générer un pacemaker bio-artificiel fonctionnel. Le couplage intercellulaire entre les cellules du nœud sinusal et le myocarde atrial joue un rôle important dans la domination de la fréquence de ce pacemaker physiologique. En effet, au sein du nœud sinusal les cellules sont caractérisées par un faible couplage intercellulaire ; ce sont d'ailleurs les connexines 45 et 30.2, de faible conductance, qui sont préférentiellement exprimées au niveau de ce tissu nodal. Ce faible couplage intercellulaire joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement du pacemaker physiologique puisqu'il permet la propagation de l'activité électrique spontanée vers le myocarde avoisinant. Des études réalisées dernièrement se sont intéressées non seulement à reproduire une activité automatique spontanée mais également ce faible couplage intercellulaire afin d'améliorer la fonction pacemaker.

Dans ce but, des cardiomyocytes déficients pour la connexine 43 et dérivés de cellules souches embryonnaires de souris (Cx43<sup>-/-</sup> ESdCs) ont été cultivés *in vitro* pour générer une fonction pacemaker. Ces cellules ont été capables de se coupler avec une lignée de cellules musculaires cardiaques (HL-1) et donc de produire une activité automatique. L'expression de la connexine 43 n'a pas été nécessaire à ce couplage entre les différentes cellules. Au contraire, la réduction du couplage intercellulaire entre les cellules Cx43<sup>-/-</sup> ESdCs et les cellules HL-1 a amélioré la fonction pacemaker de ces cellules et a permis ainsi une meilleure propagation de l'excitabilité cellulaire spontanée des Cx43<sup>-/-</sup> ESdCs vers les cellules HL-1 (Fahrenbach et coll., 2008).

Toujours dans l'objectif de reproduire ce faible couplage intercellulaire existant au niveau des cellules du nœud sinusal et afin d'améliorer la fonction pacemaker, une autre étude *in vitro* a été réalisée. Des cellules souches mésenchymateuses de rat, exprimant le gène HCN4 et le gène codant pour la connexine 45 (CSM HCN4<sup>+</sup> Cx45<sup>+</sup>) ont été mises en

coculture avec des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés. L'expression de la connexine 45 a permis d'améliorer la fréquence des battements enregistrés des cellules CSM HCN4<sup>+</sup> Cx45<sup>+</sup> (147 BPM versus 129 BPM) par rapport aux cellules en coculture avec des cellules souches mésenchymateuses de rat exprimant seulement le gène HCN4 (Tong et coll., 2010).

## **II. L'approche génique**

Les avancées dans le domaine de la thérapie génique cardiaque sont porteuses de grandes promesses pour l'éventuel traitement de pathologies cardiaques. Le but de cette approche est d'apporter un ou plusieurs gènes aux tissus cibles afin de créer une fonction pacemaker.

La première approche de transfert de gène avait pour objectif d'améliorer le tonus adrénergique du pacemaker cardiaque natif en transfectant les récepteurs adrénergiques dans la région tissulaire. Edelberg et ses collaborateurs furent les premiers à prouver la faisabilité de ce concept (Edelberg et coll., 1998 et 2001). Dans leurs études, Edelberg et ses collaborateurs ont incorporé le gène codant pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique de type 2 (Adrb2) dans un plasmide nu et l'ont injecté dans la paroi de l'oreillette droite de souris ou de porc. Le rythme auriculaire était augmenté de 40% chez la souris et de 50% chez le porc pendant 24 heures, 2 jours après l'injection. Cette stratégie n'avait pas pour but de modifier des cellules cardiaques « passives » en cellules capables de déclencher la contraction du muscle cardiaque. Les limites de cette stratégie sont que les pacemakers endogènes défectueux sont toujours intacts ; il n'y a donc pas de création d'un pacemaker bio-artificiel capable d'imposer un nouveau rythme. De plus, le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est utilisé en

tant que stimulateur non spécifique du rythme cardiaque. Cela peut influencer des canaux autres que les canaux HCN également sensibles aux catécholamines.

Face à ces limites, l'idée de manipuler directement les canaux ioniques pour modifier les cardiomyocytes quiescents en cellules pacemakers semble plus appropriée. Les deux principaux courants dont l'expression est modulée dans ce but sont le courant potassique à rectification entrante,  $I_{K1}$ , et le courant pacemaker,  $I_f$ .

La première approche pour créer *de novo* un pacemaker bio-artificiel en apportant une activité spontanée aux myocytes a été réalisée par Miake et ses collaborateurs (Miake et coll., 2002). Ils ont expérimenté, en apportant le gène codant pour un isoforme dominant-négatif de Kir2.1, qui génère  $I_{K1}$ , de modifier le substrat électrophysiologique de ces cellules en vue de générer un pacemaker bio-artificiel. La substitution des acides aminés Glycine, Tyrosine et Glycine en position 144 à 146 par trois Alanines produit un isoforme dominant-négatif du gène Kir2.1, Kir2.1 AAA, codant pour des sous-unités à l'origine de canaux non conducteurs. Le but était, grâce à l'utilisation de cet isoforme, de réduire  $I_{K1}$  dans les cellules ventriculaires. Ce gène est transfecté, via un adénovirus, dans la cavité ventriculaire gauche de cobayes. Trois à quatre jours après l'injection, la densité de  $I_{K1}$  enregistrée à la surface des myocytes ventriculaires est réduite d'approximativement 80% et un rythme ventriculaire ectopique est enregistré sur les électrocardiogrammes. Ce pacemaker bio-artificiel ainsi réalisé répond à une stimulation  $\beta$ -adrénergique, car le rythme est augmenté lors d'une stimulation par un agoniste  $\beta$ -adrénergique. Cette augmentation de fréquence est probablement due à une régulation des canaux  $Ca^{2+}$  de type L. Suite à ces résultats, Miake et ses collaborateurs ont donc conclu que la suppression spécifique de  $I_{K1}$  était suffisante pour produire une activité pacemaker dans les cellules ventriculaires. Cette conclusion fût confirmée en 2009 par Sekar et ses collaborateurs. Dans leur étude, ils ont mis en coculture des cardiomyocytes ventriculaires de rat exprimant ou non cet isoforme dominant-négatif et

ont pu cartographier l'origine d'une activité automatique au niveau des myocytes exprimant cet isoforme (Sekar et coll., 2009).

Cependant, dans une étude postérieure Miake et ses collaborateurs ont montré que l'atténuation d' $I_{K1}$  par l'expression du dominant-négatif entraîne un ralentissement de la phase de repolarisation et donc un allongement de la durée du potentiel d'action (Miake et coll., 2003). Cet allongement du potentiel d'action augmente la dispersion transmurale de la repolarisation et peut être à l'origine d'activité déclenchée par des post-dépolarisations précoces (early afterdepolarizations, EAD) conduisant ainsi à des arythmies ventriculaires (Brugada et coll., 1985. January et coll., 1992). Ainsi, la suppression de  $I_{K1}$  semble être plus appropriée en tant que modulateur du pacemaker bio-artificiel.

Des modèles mathématiques non linéaires ont permis de démontrer la possible utilisation combinée d' $I_{K1}$  et d' $I_f$ . Théoriquement, dans les cardiomyocytes ventriculaires humains sous-exprimant  $I_{K1}$  (diminution de 25% de la conductance de  $I_{K1}$ ), l'expression de  $I_f$  facilite l'automatisme. L'automatisme généré par la surexpression de  $I_f$  est améliorée du point de vue de sa stabilité et de sa capacité à initier une activité spontanée lorsque la conductance de  $I_{K1}$ , dans les cellules non automatiques voisines est réduite à une plus faible valeur (Kurata et coll., 2007). En 2009, une étude *in vitro* a été réalisée. Des cardiomyocytes ventriculaires de cobayes exprimant  $I_f$  et sous-exprimant  $I_{K1}$  ont été étudiés. Les conclusions de cette étude étaient que la synergie de la suppression de  $I_{K1}$  et de l'expression de  $I_f$  était capable de produire une fonction pacemaker. Cependant, il était important de trouver une fine balance entre l'expression de  $I_f$  et celle de  $I_{K1}$  afin d'éviter la survenue des arythmies (Tse et coll., 2009).

Enfin, un autre modèle mathématique, le modèle multicellulaire linéaire de potentiel d'action de Luo-Rudy, a également démontré la possible émergence d'une activité automatique par surexpression de  $I_f$  ou par suppression de  $I_{K1}$ . La différence entre ces deux



types d'approches est la réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. La stimulation  $\beta$ -adrénergique entraîne des effets négligeables sur la fréquence des potentiels d'action générés par la suppression de  $I_{K1}$ . En revanche, la stimulation  $\beta$ -adrénergique des cellules surexprimant  $I_f$  induit une augmentation de la fréquence d'automatisme de 30% (Viswanathan et coll., 2006).

Au vu de ces différentes études, l'expression de  $I_f$  apparaît donc comme une cible attractive en vue de réaliser un pacemaker bio-artificiel. Ses effets sont limités à la phase de dépolarisation diastolique et n'affectent donc pas la repolarisation du potentiel d'action. Plusieurs équipes se sont donc intéressées à l'utilisation des différents isoformes de HCN pour conduire à une fonction pacemaker. La preuve que la surexpression du canal générant le courant de pacemaker  $I_f$  pouvait conduire à créer un pacemaker bio-artificiel cardiaque fût apportée en 2003 par Qu et ses collaborateurs. Ils ont tout d'abord vérifié que la transfection par HCN2 pouvait augmenter significativement l'activité spontanée de cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Qu et coll., 2001). Ensuite, par une étude *in vivo*, ils ont généré un pacemaker via l'injection adénovirale du gène HCN2 dans le muscle auriculaire gauche (Qu et coll., 2003) ou dans la branche gauche du faisceau de His de chiens (Plotnikov et coll., 2004).

Cette faisabilité de générer un foyer pacemaker par la surexpression de HCN2 au sein d'un tissu originellement quiescent fut de nouveau confirmée dans un modèle de chien avec une dysfonction sinusale (*sick sinus syndrome* ; Niu et coll., 2006). La fréquence cardiaque est significativement augmentée 24 heures après l'injection du gène dans la région du nœud sinusal de l'animal. L'expression de HCN2, révélée par RT-PCR et de manière indirecte par la visualisation de la fluorescence émise par la GFP (*green fluorescence protein*), le gène rapporteur, avait permis d'augmenter le rythme cardiaque d'environ 50%, passant ainsi de 105 battements par minute (BPM) chez les chiens contrôles à 150 BPM chez les chiens injectés.

L'isoforme HCN4, isoforme majoritaire dans les tissus nodaux automatiques des différentes espèces, a également été employé. Une première étude réalisée par Er et ses collaborateurs en 2003 avait démontré que la surexpression de HCN4 dans des myocytes ventriculaires néonataux en culture accélérât la fréquence de battement dans les mêmes proportions que la surexpression de HCN2 (Er et coll., 2003). Sur la base de ces résultats, Cai et ses collaborateurs ont, par la suite, réussi à générer un pacemaker en surexprimant le gène HCN4 (Cai et coll., 2007). Dans un modèle de porc en bloc AV induit quatre à cinq jours après injection adénovirale du gène HCN4, le rythme d'échappement ventriculaire enregistré est en moyenne de 69 BPM contre 41 BPM chez les porcs non injectés. A la différence des études antérieures utilisant l'isoforme HCN2, la sensibilité au système nerveux sympathique a été cette fois-ci étudiée. Ces travaux ont révélé que le rythme idioventriculaire en présence de HCN4 est augmenté de 33% par une stimulation adrénergique induite par l'injection d'isoprénaline.

Un autre pacemaker bio-artificiel a été créé en utilisant une forme mutante du gène HCN1, HCN1- $\Delta$ - $\Delta$ - $\Delta$ . Cette mutation correspond à une délétion d'une partie du segment S3-S4 (EVY 235-237) qui favorise l'état d'ouverture du canal (Tsang et coll., 2004). Ce canal muté, HCN1- $\Delta$ - $\Delta$ - $\Delta$ , a été exprimé dans des cardiomyocytes ventriculaires ou auriculaires de cobayes isolés. Il a permis de générer un courant dont les caractéristiques électrophysiologiques miment plus correctement que les canaux HCN1 non mutés celles du courant If hétéromultimérique des tissus nodaux. A partir de ces résultats, Tse et ses collaborateurs ont ainsi créé un pacemaker bio-artificiel fonctionnant à un rythme physiologique chez le porc, c'est-à-dire de l'ordre de 70 BPM, dans un modèle de porc avec un *sick sinus syndrome* (Tse et coll., 2006). Dix à quatorze jours après injection du canal HCN1- $\Delta$ - $\Delta$ - $\Delta$  dans la paroi auriculaire gauche, un rythme atrial spontané avec une moyenne de 64 BPM est enregistré. Les animaux étant équipés d'un pacemaker électronique,

l'émergence de ce foyer ectopique permet de réduire la dépendance temporelle à ce stimulateur de 69% à 14%. Cependant, le pacemaker bio-artificiel ainsi créé n'est pas régulé par le système nerveux autonome puisque l'administration d'isoprénaline ne permet pas, ou très peu, d'augmenter le rythme spontané atrial.

Une autre stratégie a été d'utiliser une construction adénovirale codant pour une chimère HCN212 contenant les parties N- et C-terminale de l'isoforme HCN2 et la région transmembranaire de HCN1 de façon à bénéficier des cinétiques d'activation de HCN1 et de la forte sensibilité à l'AMPc de l'isoforme HCN2. Le gène codant pour cette chimère a été injecté dans la branche gauche du faisceau de His de chien. Tous les chiens injectés avec la chimère présentent des épisodes de tachycardie ventriculaire (TV). L'origine de ces TV a été localisée par cartographie au niveau du site d'injection de la chimère. De plus, ces épisodes de TV ont été supprimés en utilisant un inhibiteur spécifique de  $I_f$  (Plotnikov et coll., 2008).

Enfin, une autre approche pour la genèse d'un pacemaker bio-artificiel par transfert de gène a été l'utilisation d'un canal synthétique. Kashiwakura et ses collaborateurs ont proposé l'utilisation d'un canal pas ou peu exprimé dans les tissus quiescents et dont quelques mutations ponctuelles lui permettrait de générer un courant mimant les caractéristiques de  $I_f$ . C'est pour cette raison que le canal potassique sortant transitoire activé normalement par des dépolarisations, Kv1.4, fut converti en canal non sélectif activé par des hyperpolarisations grâce à quatre mutations (trois mutations, R447N, L448A et R453I, localisées dans le segment S4 et la quatrième, G528S, au niveau du filtre de sélectivité du pore). La transfection de ce canal synthétique génère, dans des cellules HEK293, un courant entrant avec des cinétiques d'activation proches de HCN. Chez des cobayes rendus bradycardes chimiquement, il permet de générer un rythme ventriculaire (Kashiwakura et coll., 2006). En effet, des foyers ectopiques monomorphes chez les cobayes injectés avec le canal synthétique

sont enregistrés soixante-douze heures après injection alors qu'aucun foyer ectopique n'est observé chez les cobayes contrôles.

Toutes ces études ont donc permis la genèse d'un pacemaker bio-artificiel. Cependant, la principale limite de ces études, qui est d'ailleurs un problème inhérent à la thérapie génique, est l'utilisation d'adénovirus. En effet, les adénovirus défectifs pour la réplication possèdent un potentiel infectieux qui conduit à une expression transitoire de la fonction pacemaker et à une réponse inflammatoire. L'expression du transgène n'est ainsi que transitoire et non détectable dans la plupart des tissus après deux semaines. Ceci s'explique en partie par son incapacité à s'intégrer au génome en restant en général sous forme extra-chromosomique, épisomale. Ce profil d'expression ne convient donc pas à la correction à long terme d'une maladie chronique.

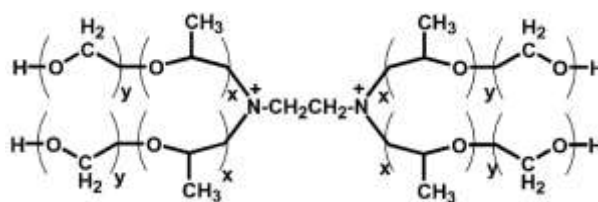
Les rétrovirus sont susceptibles de permettre une fonctionnalité à long terme du fait de l'intégration du vecteur au génome, mais ils présentent un fort risque carcinogène et infectieux. De plus ils sont rapidement inactivés par le système du complément humain ce qui les rend inutilisables *in vivo*. Les rétrovirus pénètrent dans le noyau pendant la phase de mitose, or les myocytes sont des cellules post-mitotiques. Ils s'avèrent donc inutilisables en thérapie cardiaque. Parmi les rétrovirus, seuls les lentivirus pénètrent activement dans le noyau et peuvent donc traduire les cellules quiescentes.

De la même manière, les virus adéno-associés (AAV) transduisent efficacement les cellules prolifératives et quiescentes. Il est à noter que dans les myocytes, le transgène s'associe de manière stable à la chromatine sous forme de concatémères circulaires de grande taille, non intégrés aux chromosomes. L'AAV apparaît donc comme un vecteur de choix pour l'obtention d'une expression à long terme d'un transgène, mais à condition que ce dernier soit de petite taille. En effet, le transgène ne doit pas dépasser 5000 nucléotides. Il en est d'ailleurs

de même pour les rétrovirus et lentivirus qui présentent l'inconvénient majeur de limiter la taille du transgène à 7,5 kb et 8 kb respectivement.

C'est donc pour ces raisons que l'utilisation des vecteurs non viraux, dans le cadre de la thérapie génique, semble être la stratégie la plus pertinente. En effet les vecteurs non viraux sont caractérisés par une absence de pathogénicité et d'immunogénicité qui laisse envisager des administrations répétées et une grande flexibilité quant à la taille de la molécule d'ADN à insérer. De plus, leur production est aisée et économique.

Dans notre laboratoire, l'équipe du Dr. Bruno Pitard a développé des méthodes efficaces de transfert de gène dans le muscle cardiaque *in vivo* en utilisant des polymères amphiphiles (Pitard et coll., 2004). Face à la faisabilité de l'utilisation des vecteurs non viraux dans le cadre de la thérapie génique cardiaque, une étude a été réalisée dans notre équipe en vue de développer un pacemaker bio-artificiel par transfert non-viral de gènes. Dans cette étude, le tetronic 304, un co-polymère à blocs de type poloxamine, (figure 13) a été utilisé. Des mélanges comprenant le vecteur et deux plasmides codant respectivement pour le canal HCN2, portant le courant pacemaker  $I_f$ , et pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, ont été injectés au niveau de la paroi ventriculaire gauche chez des souris en bloc AV complet (Piron et coll., 2008).



**Figure 13 : Structure générale des poloxamines.**

Les polymères amphiphiles, ou copolymères à blocs amphiphiles et non-ioniques, sont constitués de groupements éthylène oxyde (EO) hydrophiles et de groupements propylène oxyde (PO) hydrophobes, arrangés en une structure de type  $(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x$ .

L'injection de ces deux plasmides a généré des rythmes d'échappement ventriculaire plus rapides que le rythme d'échappement naturel d'une souris contrôlée injectée avec un plasmide non-codant. Ce pacemaker bio-artificiel a ainsi permis de prolonger la survie des souris de trois semaines. Cependant, ces souris, tout comme les souris contrôles, meurent progressivement d'une insuffisance cardiaque. Il semble donc important pour prévenir l'apparition de cette pathologie d'augmenter le rythme d'échappement ventriculaire du pacemaker bio-artificiel. C'est d'ailleurs l'un des objectifs de ce travail de thèse. Dans ce but, nous avons décidé de remplacer le gène codant pour HCN2 par un gène codant pour une protéine de fusion contenant deux isoformes du gène HCN. L'isoforme HCN1 aux cinétiques d'activation rapides et l'isoforme HCN2 présentant une bonne régulation par le système autonome.

### **III. Une Nouvelle approche : la reprogrammation cellulaire**

Cette nouvelle stratégie repose sur l'hypothèse que la surexpression ou l'inactivation d'un ou plusieurs facteurs de transcription transformerait des cellules quiescentes en cellules pacemaker, c'est-à-dire, modifierait le phénotype de ces cellules pour un phénotype proche ou identique de cellules automatiques du nœud sinusal. Ces cellules exprimeraient non seulement un ou deux gènes permettant une activité automatique spontanée, mais l'ensemble des gènes jouant un rôle dans la genèse des potentiels d'action automatiques et permettant la propagation de l'activité électrique vers les cellules avoisinantes. Le but est donc de créer un foyer d'automatisme fonctionnant de manière identique au pacemaker physiologique du cœur, le nœud sinusal.

Cette nouvelle approche peut donc être utilisée en complément de la thérapie cellulaire. C'est d'ailleurs ce qui est proposé par Barbuti et ses collaborateurs (2010) qui, dans une étude récente, ont réussi à reprogrammer des mésoangioblastes, cellules souches adultes provenant des vaisseaux sanguins, en cellules pacemaker ayant un phénotype proche de cellules automatiques nodales. Cette différenciation a été possible par la transfection des mésoangioblastes par la Lipofectamine avec le facteur de transcription GATA-6. Ce facteur de transcription est activé précocément au moment du développement cardiaque des vertébrés (Davis et coll., 2001 ; Adamo et coll., 2004). Ces cellules, une fois différenciées en cellules cardiaques, expriment le gène HCN4 et la connexine 45. De plus, l'étude électrophysiologique a montré une diminution de  $I_{K1}$  dans ces cellules différenciées et la présence de potentiels d'action spontanés (Barbuti et coll., 2010). Ainsi ces résultats ont montré la faisabilité de reprogrammer des cellules non automatiques en cellules présentant un phénotype nodal.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a consisté à utiliser cette nouvelle approche de reprogrammation cellulaire combinée avec l'approche génique. Sur la base des travaux de Hoogars et ses collaborateurs (2007), nous nous sommes intéressés au facteur de transcription Tbx3. Dans l'étude de Hoogars, la surexpression de Tbx3 permettait de donner aux cellules cardiaques atriales un phénotype sinusal. Nous avons donc décidé d'étudier la faisabilité de générer des cellules automatiques à partir de cellules ventriculaires.

## RESULTATS

### **PROJET 1 : DEVELOPPEMENT D'UN PACEMAKER BIO-ARTIFICIEL PAR TRANSFERT NON-VIRAL D'UNE PROTEINE DE FUSION HCN1-HCN2 DANS UN MODELE DE SOURIS EN BLOC AURICULO-VENTRICULAIRE COMPLET.**

#### **I. Introduction**

La seule thérapie actuelle possible des troubles de la conduction cardiaque tels que les blocs auriculo-ventriculaires ou les dysfonctions sinusales est l'implantation d'un stimulateur électronique cardiaque (pacemaker). Bien que les pacemakers électroniques représentent un moyen thérapeutique efficace, ce dispositif présente de nombreux inconvénients. Les complications les plus courantes sont des infections, des embolies, des dysfonctions mécaniques. D'autres problèmes sont la durée de vie limitée de la batterie qui conduit à un remplacement d'une partie ou de la totalité de l'appareillage et l'absence de modulation du rythme du pacemaker via le système hormonal (stress, activité physique, émotion...).

La thérapie génique est une approche attractive pour créer des pacemakers bio-artificiels en vue de traiter les pathologies de la conduction cardiaque. Ainsi de nombreuses études ont déjà prouvé la faisabilité de ce concept, en sur-exprimant par exemple : le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Edelberg et coll., 1998 et 2001), une isoforme dominante négative de Kir2.1 (Miake et coll., 2002), le gène codant pour l'isoforme HCN2 du canal pacemaker responsable du courant  $I_f$  (Qu et coll., 2003 ; Plotnikov et coll., 2004). Cependant, la plupart de ces approches ont un problème inhérent qui est l'utilisation de virus pour délivrer le gène d'intérêt. C'est d'ailleurs une des principales limites de la thérapie génique cardiaque.

Dans le but de s'affranchir de cette limite, nous avons décidé d'utiliser un vecteur non-viral, le tetronic 614, pour le développement d'un pacemaker bio-artificiel, *in vivo*, chez des souris en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). Dans une étude antérieure (Piron et



coll., 2008), nous avons démontré l'efficacité de ce type de vecteur en induisant une expression ventriculaire locale du canal HCN2 et du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Ces deux gènes n'ont cependant pas permis d'obtenir des rythmes automatiques suffisamment rapides pour envisager leur utilisation à des fins thérapeutiques. Dans la présente étude, nous avons remplacé le canal HCN2 par une protéine de fusion HCN1-HCN2, afin de bénéficier des propriétés biophysiques de HCN1, permettant l'obtention de courants plus amples, tout en conservant la régulation adrénérergique du canal HCN2.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **Etude In Vitro :**

#### **Culture cellulaire et transfection**

L'étude des courant générés par HCN2 et HCN1-HCN2 a été réalisée par ré-expression des plasmides codant ces deux protéines dans une lignée cellulaire d'origine tumorale. Il s'agit des cellules COS-7 issues de fibroblaste de rein de singe (Gluzman, 1981) immortalisés par transformation avec un mutant du virus simien SV40. Ces cellules sont cultivées dans des flasques en plastique de 25 cm<sup>2</sup> dans un incubateur humidifié à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

Les cellules COS-7 sont transfectées en utilisant 8µl de FuGENE 6 comme agent de transfection dans 92µl de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) et 2µg de plasmides. Les plasmides utilisés pour cette étude sont le pcDNA3 HCN1-HCN2 (Pr. Bayliss, Université de Virginie, USA), le pcDNA3 HCN2 et le plasmide pIRES-CD8 utilisé comme témoin de transfection pour les expériences de patch-clamp. Les cellules transfectées vont exprimer les molécules CD8 à leur membrane sur lesquelles les anticorps couplés aux billes magnétiques, ajouté au milieu contenant les cellules, vont pouvoir se fixer.

## Electrophysiologie

Soixante-douze heures après la transfection des cellules COS-7, une boîte de Petri de 35 mm de diamètre contenant les cellules est placée sur la platine d'un microscope inversé qui repose sur une table antivibratoire. Les cellules sont perfusées en continu avec une solution de Tyrode contenant(en mM): NaCl 145, KCl 4, HEPES 5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1, et Glucose 5. Le pH de la solution est ajusté à 7.4 à l'aide de NaOH.

Les pipettes de patch-clamp sont réalisées à partir de capillaires en verre silico-calco-sodique (Kimble Kontes, New-Jersey, USA). Leur résistance est comprise entre 2 et 3,5 MΩ. Chaque pipette est remplie avec une solution contenant (en mM): KCl 145, HEPES 10, EGTA 1 (pH ajusté à 7,2 avec de KOH). La pipette est fixée sur un porte-électrode relié à un micromanipulateur permettant de la placer avec précision sur la cellule. Cette partie mobile est connectée à un amplificateur de patch-clamp (Alembic, Canada) qui permettra d'imposer un potentiel à la cellule et d'enregistrer le courant généré par l'activation des canaux à ce potentiel. L'acquisition des données et leur analyse sont réalisées à l'aide du logiciel Acquis1, version 4.0 (Bio-logic SA).

Afin d'analyser les paramètres biophysiques du courant  $I_f$  des sauts de potentiels variables sont imposés à la cellule. Le potentiel de maintien (Holding potentiel) est de -30 mV. Pour activer le courant la cellule est hyperpolarisée à -100 mV pendant 1500 ms. La courbe courant potentiel est obtenue avec un protocole comprenant des sauts de potentiel variant de -40 mV à -130 mV avec un incrément de 10 mV, à partir d'un potentiel de maintien de -30 mV. Les expériences sont réalisées à 35°C.

## **Etude *in vivo* :**

### **Formulation des plasmides**

Les plasmides utilisés lors des différentes expériences possèdent le même promoteur humain du cytomégalo virus (CMV). Les plasmides pcDNA3-mHCN1-HCN2 (fournis par le Pr. Bayliss, Université de Virginie, USA) et pcDNA3-ADRB2, contiennent respectivement les séquences codantes des gènes murins codant pour le concatémère des canaux pacemaker HCN1 et HCN2, le canal HCN2 et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (ADRB2). Le plasmide pcDNA3 ne contenant aucune cassette d'expression est utilisé pour les souris témoins (*sham*).

La formulation de l'ADN avec le tétronic 614, un poloxamine fourni par BASF (Mount Olive, NJ), est préparée sous forme d'un mélange équivolumique de tétronic 614 (10% dans de l'eau) et d'ADN plasmidique (25% de plasmide pcDNA3-ADRB2 et 75% de plasmide pcDNA3-mHCN1-HCN2) dans une solution de Tyrode.

### **Injection des transgènes**

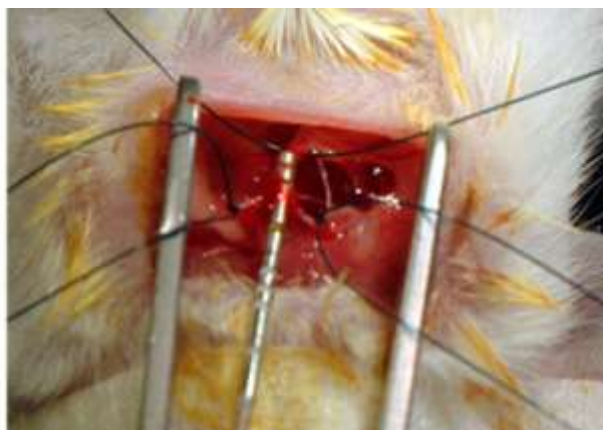
Les souris mâles adultes sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de Kétamine (100 mg/kg ; Imalgène 500<sup>®</sup>, Merial, France) et de Xylazine (20 mg/kg ; Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Pharma, France). Une analgésie est obtenue par injection sous cutanée de 1mg/kg de Nalbuphine (Nubain<sup>®</sup>, CERB, France). Les souris sont ventilées à 120 cycles par minute à l'aide d'un ventilateur (Minivent Type 845, Hugo Sachs Electronik). La température corporelle est maintenue avec un tapis chauffant. Après thoracotomie gauche dans le cinquième espace intercostal, chaque souris reçoit une injection de 10  $\mu$ L de solution d'ADN

(38 $\mu$ g/10 $\mu$ L) et de tétronic 214 avec une seringue Hamilton 10  $\mu$ L dans la paroi du ventricule gauche.

### **Induction du bloc auriculo-ventriculaire par radiofréquence**

Douze heures puis trente minutes avant l'induction du BAVc, une injection intramusculaire d'aspirine (Aspégic 500mg) à la dose de 20mg/Kg est réalisée afin de prévenir la formation de caillots pendant l'ablation. Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A). La souris est placée sur un tapis chauffant rétrocontrôlé par une sonde rectale afin de maintenir une température corporelle de 37°C, et un ECG de surface D1 est enregistré pendant 3 minutes à l'aide de deux électrodes sous-cutanées de calibre 25 Gauge.

Ensuite, une analgésie par injection sous cutanée de Nubain 3 $\mu$ g/kg et une anesthésie locale par injection de xylocaïne 1% (dose 40mg/kg) sous-cutanée sont réalisées. La veine jugulaire droite est enfin isolée et une sonde quadripolaire 2F avec un espacement entre électrodes de 0,5 mm (Cordis Webster®, USA) est alors introduite dans le cœur via cette veine jugulaire droite (figure 14).



**Figure 14 : Introduction de la sonde dans la veine jugulaire droite.**

La sonde d'exploration est positionnée afin d'obtenir l'enregistrement de l'activité électrique du faisceau de His ainsi que les signaux atrial et ventriculaire. L'ECG de surface D1 et l'électrogramme intracardiaque sont enregistrés sur un ordinateur à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (IOX 1.585, Emka Technologies, Paris, France) pour monitoring et analyse ultérieure avec le logiciel ECG-Auto (Emka Technologies). Une stimulation ventriculaire programmée est réalisée avec un stimulateur UHS 20 Biotronik. Le seuil de stimulation, correspondant à l'énergie minimale entraînant une dépolarisation ventriculaire est déterminé et les stimulations sont ensuite effectuées à une intensité de une fois et demi ce seuil.

Après la détection stable de l'activité du faisceau de His, l'ablation par radiofréquence est réalisée avec un générateur H200S (Osypka) à une intensité de 2 W pendant 15 s entre deux électrodes de grande surface (électrodes numérotées 3 et 4). Si le premier tir est efficace, le rythme sinusal est supprimé, le ventricule bat à un rythme d'échappement idioventriculaire : la souris est en bloc auriculo-ventriculaire chronique (BAVc). En cas d'échec, un second tir est tenté après une pause de 5 minutes (3 tirs au maximum pour chaque souris).

Après ablation, la souris est stimulée au niveau ventriculaire à un rythme d'environ 240 bpm (RR = 250 ms) pendant 5 minutes. A l'issue de cette période, la valeur de l'intervalle RR du rythme d'échappement spontané est déterminée. La souris est ensuite stimulée en continu au rythme de 240 bpm pendant 5 minutes, puis injectée avec une dose de 200 ng/g d'Isoprénaline (Isoprénaline chlorhydrate) par voie intrapéritonéale. A la fin de la procédure, la sonde est retirée, la veine jugulaire puis la souris sont recousues et une nouvelle dose de Nubain 3µg/kg est administrée par une injection intrapéritonéale. Ensuite la souris est mise sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie jusqu'au réveil.

## Suivi à long terme

Le fonctionnement du pacemaker bio-artificiel par transfert de gène dans notre modèle est suivi par un simple ECG de surface à de dates définies.

Les souris sont anesthésiées grâce à une injection intrapéritonéale d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A). Les animaux sont ensuite placés dorsalement sur le tapis chauffant et des ECG six dériviations sont réalisés à l'aide de quatre électrodes sous-cutanées de 25 gauge placées à chacun des membres antérieurs et postérieurs de la souris.

Les ECGs de surface sont enregistrés et analysés grâce aux logiciels spécifiques de conversion analogique numérique IOX-1.585 et ECG auto (EMKA technologies, Paris, France).

Les intervalles P, PR, QRS, QT et RR sont mesurés sur cinq complexes successifs de l'ECG de surface D1 et moyennés. Le complexe QRS est mesuré du début de l'onde Q jusqu'au point d'intersection entre la ligne isoélectrique et la pente ascendante allant du sommet de l'onde S à la partie positive de l'onde T. L'intervalle QT est mesuré du début du complexe QRS à la fin de l'onde T. L'intervalle PR (ou très exactement PQ) est mesuré du début de l'onde P jusqu'au début de l'onde Q (figure 15).

L'analyse de l'ECG permet également de révéler l'axe électrique du cœur, c'est-à-dire l'angle du champ électrique généré par les cellules cardiaques lors de l'activation ventriculaire. On assimile ce champ à un vecteur unique dans le plan frontal. L'axe se mesure par la comparaison des amplitudes respectives du segment QRS (positivité – négativité) dans les dériviations frontales. La plus grande positivité du QRS (onde R) donne une bonne idée de l'axe du cœur. Etant donné que la dépolarisation physiologique se fait du nœud auriculo-ventriculaire vers la pointe des ventricules, l'axe moyen du cœur est situé entre 30° et 60°. Au-delà de ces valeurs, on parle de déviation axiale gauche ou de déviation axiale droite. Un axe anormal peut être le signe de perturbations dans la séquence d'activation des ventricules

ou de dommages cellulaires. Un axe situé dans le « no man's land » ( $180^\circ - 270^\circ$ ) évoque une origine ventriculaire des QRS. Il traduit une activation de la pointe du cœur vers la base et donc le contraire de ce qui se produit en cas d'activation via le faisceau de His.

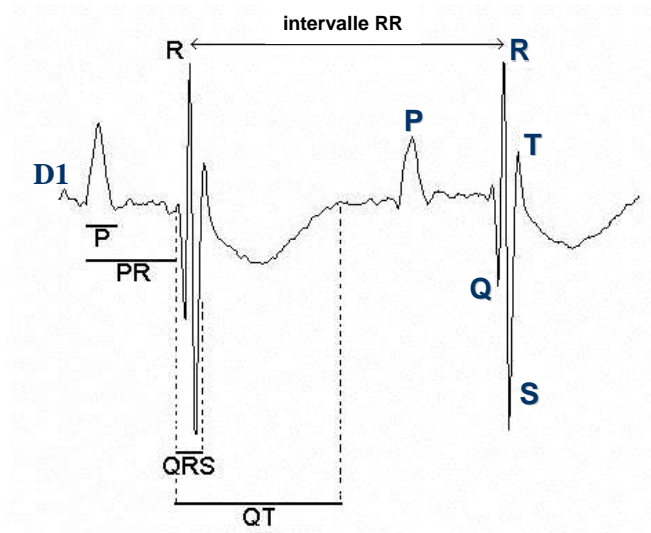


Figure 15 : Méthode de mesure des valeurs sur l'ECG de surface D1.

### Analyse statistique

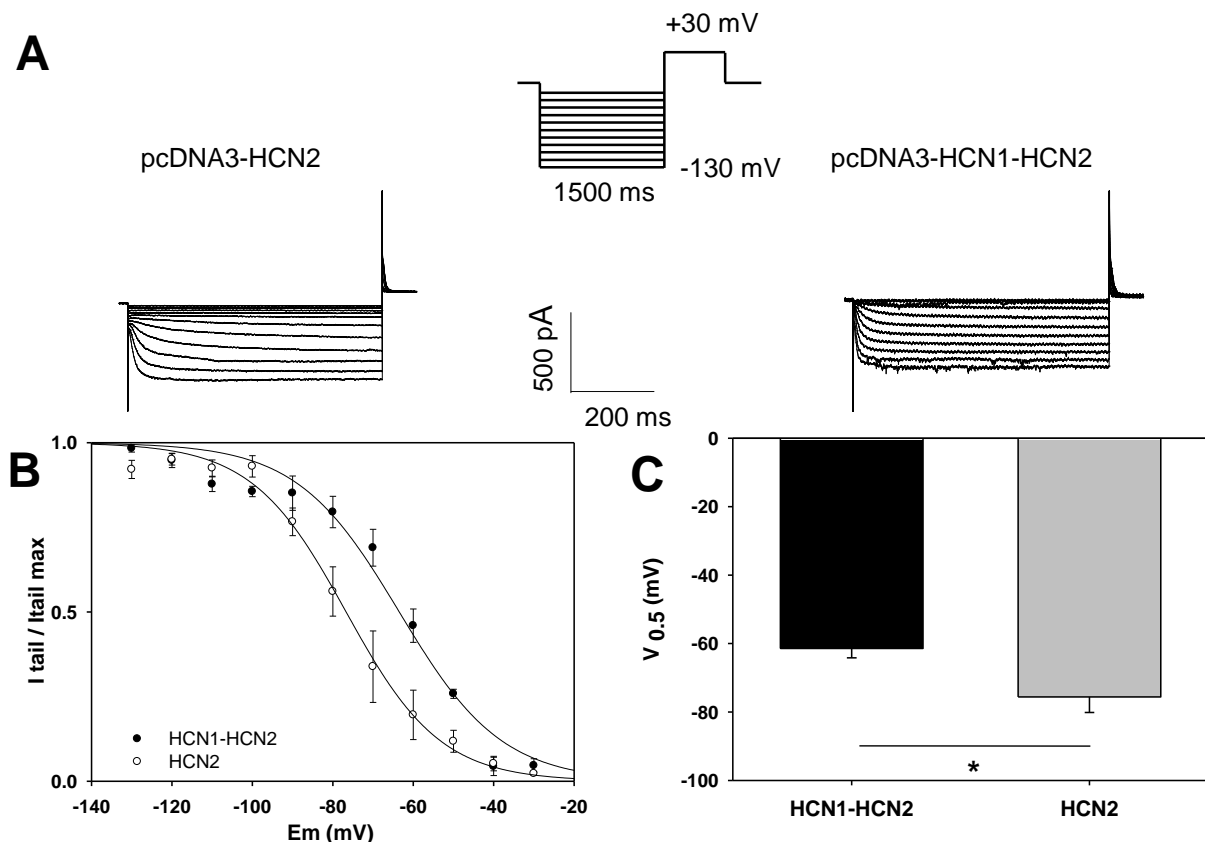
Les logiciels Microsoft Office Excel 2007 et SigmaStat 2.0 (SPSS. Inc.) ont été utilisés pour comparer les valeurs entre les groupes de souris avec le test t de Student et l'analyse de variance (ANOVA) à une voie ou deux voies complétée par un test de Tukey lorsque nécessaire. Une valeur de  $P < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (s.e.m.).



### III. Résultats

#### HCN1-HCN2 conduit à un gain de fonction par rapport à HCN2

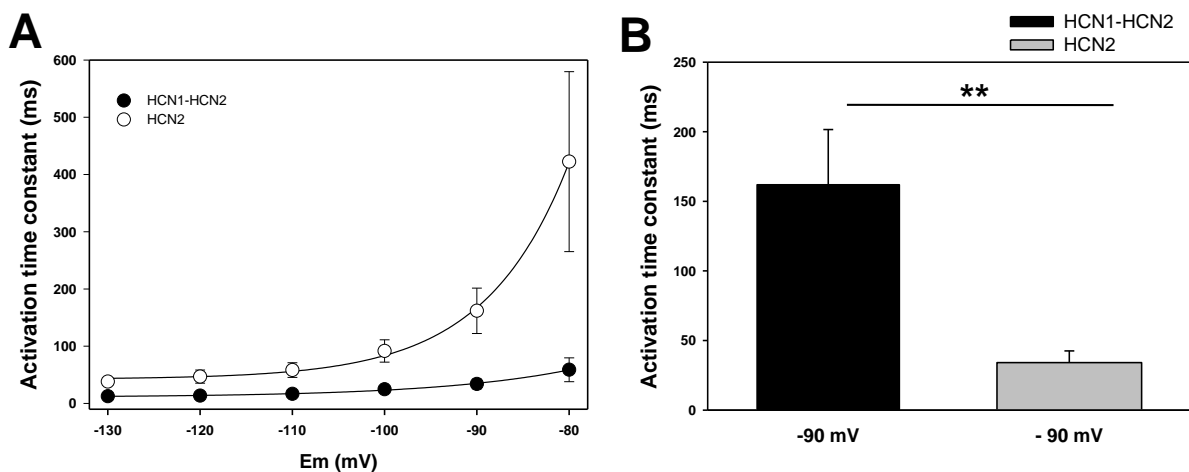
Les courants générés par les canaux HCN1-HCN2 et HCN2 ont été étudiés en patch-clamp dans un système de re-expression hétérologue, les cellules COS-7 (figure 16). Nous avons constaté un décalage significatif du potentiel de demi-activation du courant généré par la protéine de fusion HCN1-HCN2 par rapport à celui généré par HCN2 seul vers des potentiels moins négatifs. Ainsi, nous avons pu remarquer que le potentiel de demi-activation des canaux formés par HCN1-HCN2 est de  $-61,4 \pm 2,7$  mV alors que celui des canaux formés par HCN2 seul est de  $-75,6 \pm 4,5$  mV.



**Figure 16 : Etude de la dépendance au potentiel des canaux HCN1-HCN2 et HCN2.**

**A** : Courants représentatifs générés par les canaux HCN2 et HCN1-HCN2 dans des cellules COS-7. **B** : Courbes d'activation montrant le niveau relatif du courant de queue par rapport au courant de queue maximal après un saut de potentiel à -130 mV ( $I_{tail}/I_{tail\ max}$ ) en fonction du potentiel. **C** : Potentiel de demi-activation ( $V_{0.5}$ ) des canaux HCN1-HCN2 (n=5) et HCN2 (n=4). Test de Student, \*  $p < 0,05$ .

Les cinétiques d'activation de ces deux canaux suivent un déroulement mono-exponentiel. Nous avons pu noter que la protéine de fusion HCN1-HCN2 présente une cinétique d'activation plus rapide que HCN2 seul. En effet, à un potentiel de -130 mV, nous obtenons un gain d'environ 26 ms ( $38,3 \pm 6,8$  ms pour HCN2 *versus*  $12,6 \pm 2,2$  ms pour HCN1-HCN2). A ce potentiel, l'amplitude du courant est maximale et les cinétiques d'activation sont les plus rapides, mais il n'est pas physiologique. Il est intéressant de noter que c'est dans la gamme des potentiels physiologiques que l'écart entre HCN1-HCN2 et HCN2 est le plus important. En effet, la cinétique d'activation de la protéine de fusion HCN1-HCN2 est nettement plus rapide que celle de HCN2 seul ( $161,9$  ms  $\pm$   $39,6$  ms pour HCN2 *versus*  $34,1$  ms  $\pm$   $8,4$  ms pour HCN1-HCN2) (figure 17).



**Figure 17 : Constante d'activation des canaux HCN1-HCN2.**

(A) Evolution de la constante d'activation pour HCN2 et HCN1-HCN2 en fonction du potentiel. (B) Comparaison des constantes d'activation à -90 mV et -130 mV (n=5 et n=4 ; test de Student, \*\* p<0,01).

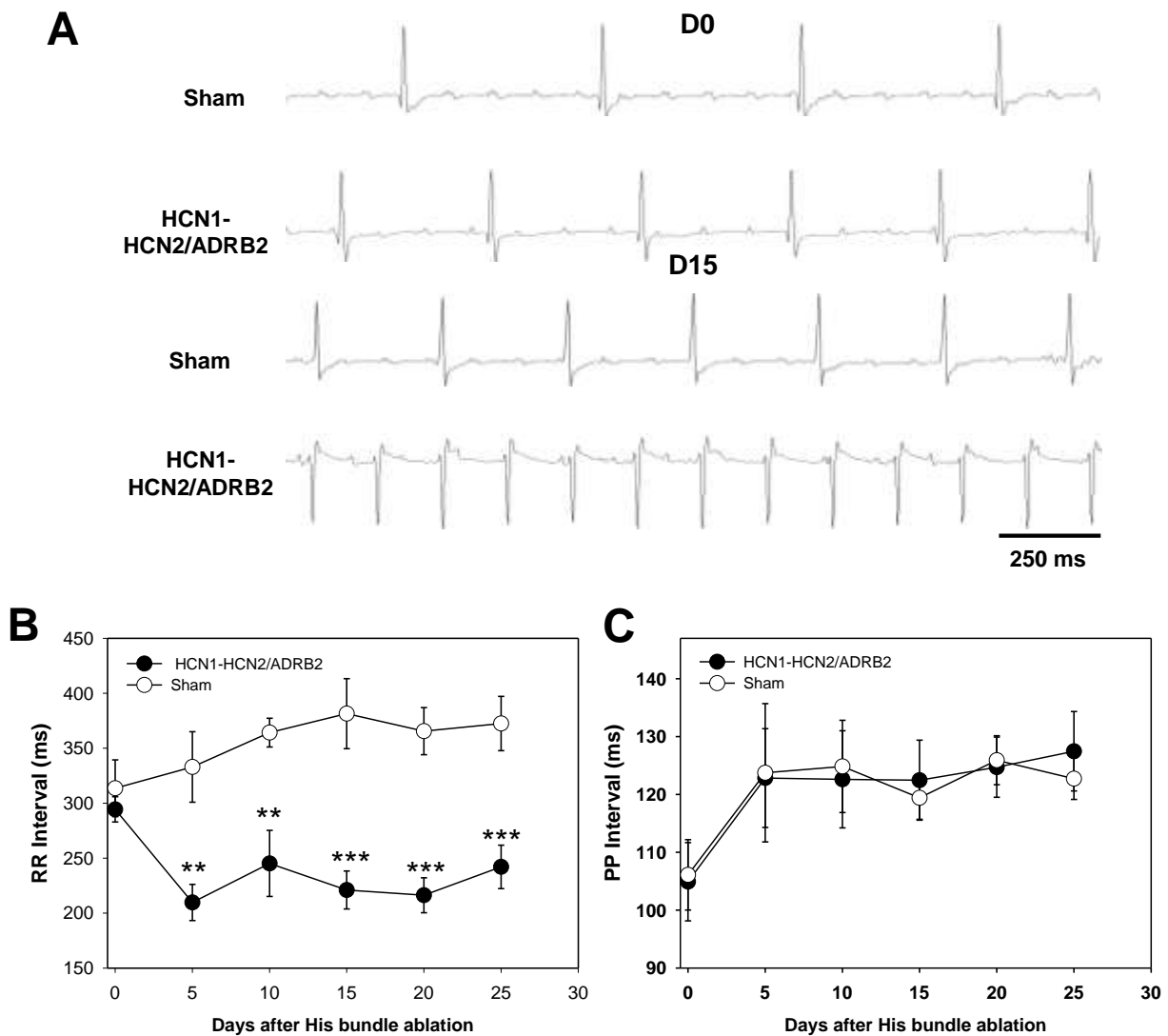
Au vu de ces données, nous pouvons conclure que nous avons un gain de fonction avec le canal HCN1-HCN2 par rapport au canal HCN2 seul. Cet avantage est visible tant au niveau du décalage du potentiel de demi-activation vers des valeurs plus physiologiques, qu'au niveau de sa cinétique d'activation qui est plus rapide. Nous avons donc à un potentiel

diastolique donné, plus de courant avec HCN1-HCN2 qu'avec HCN2 seul. Nous pouvons donc espérer retrouver ce gain de fonction *in vivo*.

### **L'expression de HCN1-HCN2/ADRB2 génère une activité pacemaker**

Sur la base des résultats de notre étude antérieure, nous avons décidé de réaliser l'ablation du faisceau de His par radiofréquence, qui conduit au BAVc, sept jours après l'injection des transgènes. Quelques minutes après l'ablation du faisceau de His, les rythmes d'échappement ventriculaires sont identiques chez les souris *sham* (n=7) et les souris HCN1-HCN2/Adrb2 (n=7) (figure 18A et 18B). De plus, l'étude de la durée des intervalles QRS et des axes électriques nous révèle des complexes également similaires dans l'ensemble des souris qui constituent les deux groupes. La durée moyenne des intervalles QRS ( $12,2 \pm 0,5$  ms chez les souris HCN1-HCN2/ADRB2 *versus*  $11,7 \pm 0,3$  ms chez les souris *sham*) et la médiane normale des axes électriques montrent que les foyers d'échappement enregistrés quelques minutes après BAVc sont vraisemblablement localisés au niveau du faisceau de His juste au-dessous de la zone d'ablation.

En revanche, dès cinq jours après BAVc, le rythme d'échappement ventriculaire des souris *sham* ralentit progressivement pendant que celui des souris HCN1-HCN2/ADRB2 s'accélère significativement puis se stabilise. Le rythme d'échappement ventriculaire des souris HCN1-HCN2/ADRB2 est ainsi plus rapide et ce, de manière significative entre cinq jours et vingt-cinq jours après BAVc. Ainsi, quinze jours après BAVc, nous obtenons un gain de rythme de l'ordre de 73 % (figure 18B). La fréquence moyenne d'échappement des souris HCN1-HCN2/ADRB2 est de  $283 \pm 24$  bpm (n=7) contre  $164 \pm 15$  bpm chez les souris *sham* (n=7). En ce qui concerne, l'évolution de l'intervalle PP, représentant le rythme sinusal, nous constatons un ralentissement du rythme sinusal au cours des cinq premiers jours puis une stabilisation. Aucune différence n'est observée entre les deux groupes (figure 18C).



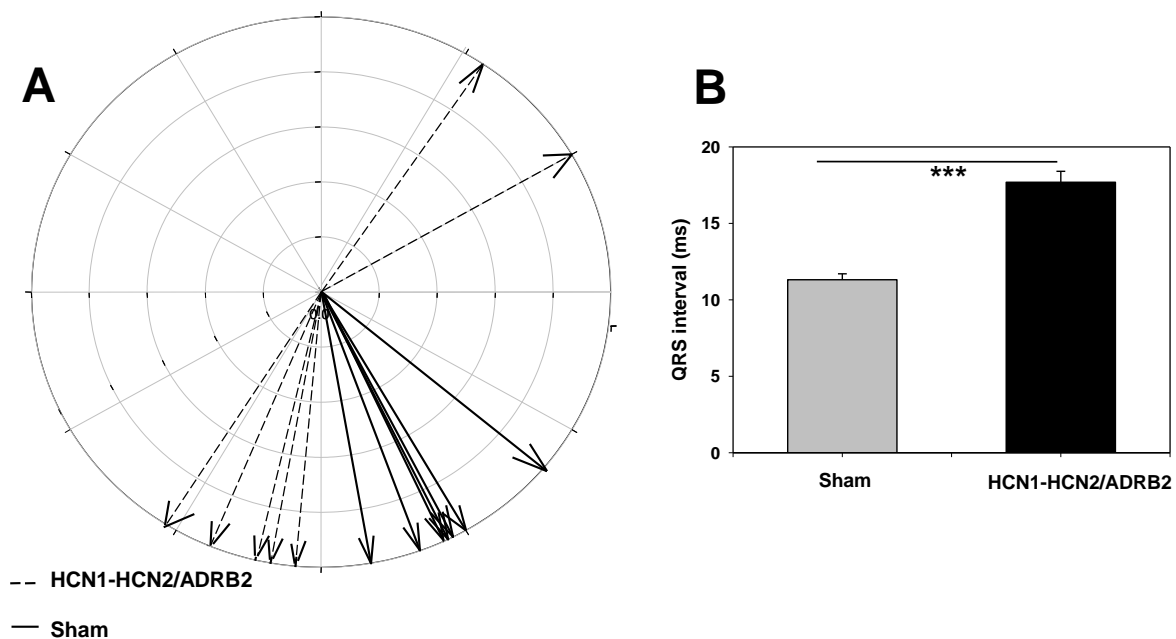
**Figure 18 : Suivi à long terme des rythmes d'échappement ventriculaires.**

(A) ECG représentatifs enregistrés chez une souris *sham* et une souris HCN1-HCN2/ADRB2 le jour de l'ablation du faisceau de His (Day 0) et 15 jours plus tard (Day 15 ; soit 22 jours après injection des plasmides). Les deux souris sont en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). (B) Suivi pendant 25 jours des intervalles RR des souris *sham* (n = 7) des souris HCN1-HCN2/ADRB2 (n = 7) après ablation du faisceau de His (Jour 0). (C) Suivi des intervalles PP des deux groupes de souris. \*\*, \*\*\* ; p<0,01 et p<0,001, respectivement *versus* les valeurs correspondantes chez les souris *sham*.

**Le rythme d'échappement des souris HCN1-HCN2 est localisé au niveau du ventricule gauche**

La caractérisation des complexes QRS enregistrés quinze jours après BAVc montre une activation anormale des ventricules chez les souris HCN1-HCN2/ADRB2. En effet, la

durée moyenne des intervalles QRS des souris HCN1-HCN2/ABRB2 est allongée à  $17.7 \pm 0,7$  ms *versus*  $11,3 \pm 0,4$  ms pour les souris *sham*. De plus l'axe électrique médian des souris HCN1-HCN2/ADRB2 est dévié vers la droite (axe QRS =  $170 \pm 40^\circ$ , 2 souris présentent une déviation axiale gauche), alors que le foyer automatique des souris *sham* reste localisé dans le septum interventriculaire (figure 19).



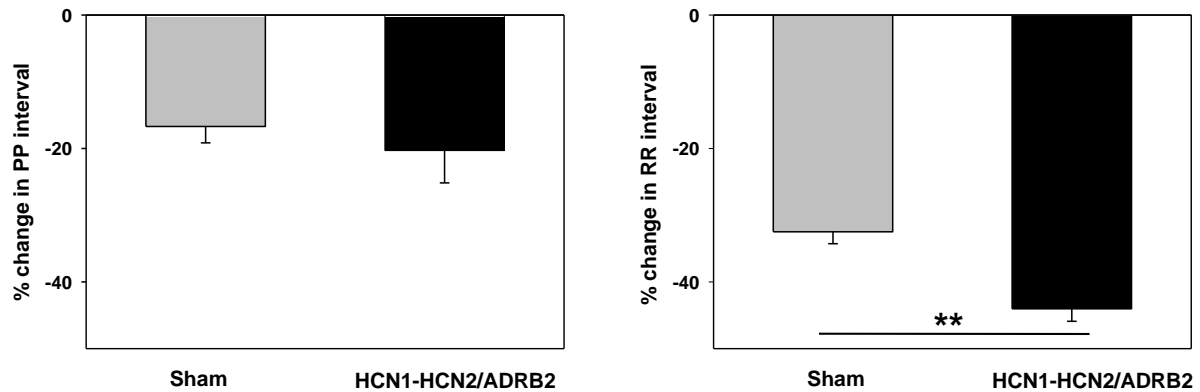
**Figure 19 : Caractérisation des complexes QRS 15 jours après ablation du faisceau de His.**

(A) Axe électrique individuel des souris *sham* (flèches continues) et des souris HCN1-HCN2/ADRB2 (flèches discontinues). (B) Moyennes (barres) et valeurs individuelles (cercles) des intervalles QRS des souris *sham* (n=7) et HCN2-ADRB2 au jour 15 (n=7). \*\*\*  $p < 0,001$  *versus* les valeurs correspondantes chez les souris *sham*.

### Le rythme du pacemaker HCN1-HCN2-AdrB2 est modulable par la régulation $\beta$ -adrénergique

Vingt-cinq jours après l'induction du BAVc, une injection d'isoprénaline, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, nous a permis de vérifier que le pacemaker bio-artificiel est bien modulable par le tonus adrénergique. Le rythme d'échappement ventriculaire est en effet

significativement plus sensible à l'isoprénaline chez les souris HCN1-HCN2/Adrb2 que chez les souris *sham*. L'augmentation du rythme du pacemaker bio-artificiel est plus importante que celle du rythme d'échappement des souris *sham* ( $44,0 \pm 1,8$  % chez les souris HCN1-HCN2/Adrb2 versus  $32,5 \pm 1,8$  % chez les souris *sham* ; figure 20).



**Figure 20 : Effet de l'isoprénaline (40 µg/kg) sur le rythme d'échappement ventriculaire après ablation du faisceau de His.**

Histogramme illustrant le pourcentage de changement des intervalles PP (à gauche) et RR (à droite) induit par l'injection d'isoprénaline chez les souris *sham* (n = 7) et les souris HCN1-HCN2/ADRB2 (n = 6). \*\*p<0,01 versus les souris *sham*.

#### **IV. Discussion**

Dans cette étude nous avons développé un pacemaker bio-artificiel grâce à une transfection non-virale de deux plasmides, codant respectivement pour une protéine de fusion HCN1-HCN2 et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique.

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes appuyés sur des travaux antérieurs de notre équipe qui avaient démontré la faisabilité de générer un pacemaker bio-artificiel dans un modèle de souris en BAVc grâce à l'utilisation de vecteurs non-viraux (Piron et coll. 2008). Ces vecteurs permettant de transférer localement plusieurs plasmides à la fois, deux gènes distincts, codant respectivement pour l'isoforme HCN2 et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, avaient été utilisés. Les résultats obtenus étaient encourageants puisque le pacemaker bio-artificiel ainsi créé avait permis de générer des rythmes d'échappement ventriculaires plus rapides que le rythme d'échappement naturel d'une souris *sham*. Cependant, chez les souris, le BAVc induit une hypertrophie ventriculaire qui dégénère en insuffisance cardiaque, conduisant à la mort de l'animal entre deux à quatre mois après l'induction du BAVc. Cette évolution pathologique avait été retrouvée aussi bien chez les souris *sham* que chez les souris HCN2/ADRB2. Il semblait donc évident que l'augmentation de la fréquence cardiaque obtenue avec le pacemaker bio-artificiel était insuffisante pour empêcher la survenue de l'hypertrophie. L'objectif de cette étude était donc d'optimiser les pacemakers afin d'augmenter leur fréquences.

Pour cela, plusieurs voies pouvaient être envisagées. La première consistait à améliorer les propriétés biophysiques du canal transfecté en augmentant l'amplitude du courant généré et en accélérant ses cinétiques d'activation. Pour ce faire, plusieurs possibilités s'offraient à nous. L'une d'elles était l'utilisation de protéines régulatrices de HCN2. Par exemple, la co-transfection de la sous-unité  $\beta$  Mirp1 (KCNE2) pouvait être envisagée

puisqu'elle a été décrite comme interagissant avec HCN2. Cette interaction directe avec HCN2 permet d'augmenter la densité d'I<sub>f</sub> et d'accélérer ses cinétiques d'activation (Yu et coll., 2001). Cependant, cette protéine est également connue pour s'associer avec d'autres canaux, en particulier potassiques (Abbott et coll., 1999; Roepke et coll., 2008; McCrossan et coll., 2009), ce qui pourrait induire des modifications de la repolarisation et entraîner ainsi des arythmies (Brugada et coll., 2004).

Une autre voie était de transférer des canaux mutés. Le mutant HCN2, Y331D, qui se caractérise par un gain de fonction, pouvait être un bon candidat (Macri et Accili, 2004). Le premier essai avec le mutant E324A de HCN2, caractérisé également par un gain de fonction, n'a pas permis de créer un pacemaker bio-artificiel plus rapide que celui obtenu avec le canal HCN2 sauvage (Bucchi et coll., 2006). Malgré une augmentation des cinétiques d'activation, le canal muté E324A génère des courants de plus faible amplitude aux alentours des potentiels proches du potentiel membranaire de repos des cardiomyocytes ventriculaires. Ceci pourrait expliquer son incapacité à produire un pacemaker plus rapide. En revanche, le mutant Y331D, peut générer des courants de plus grande densité que le canal sauvage, ce qui laisse supposer un possible gain de fonction lors de son utilisation en vue de créer un pacemaker bio-artificiel. Une chimère a également été créée. La chimère HCN212 contient les parties N- et C-terminales de l'isoforme HCN2 et la région transmembranaire de HCN1 de façon à bénéficier des cinétiques d'activation de HCN1 et de la forte sensibilité à l'AMPc de l'isoforme HCN2. La transfection de cette chimère entraîne cependant des épisodes de tachycardie ventriculaire chez les chiens au niveau du faisceau de His (Plotnikov et coll., 2008).

Enfin, une autre possibilité était de transformer d'autres canaux que les canaux HCN afin de leur fournir des caractéristiques d'activation et de régulation plus appropriées, et donc plus proches de celles de canaux HCN. Un exemple est le canal Kv1.4 converti en canal HCN grâce à quatre mutations. Le pacemaker créé par ce canal synthétique ne se caractérise par



aucun gain de rythme. De plus, la régulation par le système nerveux sympathique n'a pas été vérifiée et les auteurs n'ont décrit que des évènements fréquents de battements idioventriculaires monomorphes et non pas une activité régulière d pacemaker ventriculaire (Kashiwakura et coll., 2006).

Il semblait donc plus efficace de continuer à utiliser un canal HCN avec tous les avantages qu'il comporte, tant au niveau de sa régulation par le système nerveux sympathique qu'au niveau de sa faible conductance propice au minimum de bouleversement du fonctionnement des cellules modifiées. De plus d'autres travaux avaient déjà démontré l'efficacité de HCN2 à générer des pacemakers bio-artificiels (Qu et coll., 2003 ; Plotnikov et coll., 2004). Cependant, il était important de sélectionner des canaux pacemaker plus performants, tout en continuant à surexprimer le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique dont on sait qu'il s'associe préférentiellement avec les canaux HCN et augmente le courant pacemaker généré (Graf et coll., 2001).

Notre objectif était donc d'augmenter l'amplitude du courant généré et d'accélérer ses cinétiques d'activation afin d'accélérer le rythme d'échappement de ce nouveau pacemaker. L'utilisation d'un plasmide codant pour une protéine de fusion HCN1-HCN2 nous a permis de bénéficier de ce gain de fonction par rapport à HCN2. Notre étude électrophysiologique dans un modèle de ré-expression nous a permis de montrer qu'à des potentiels proches des potentiels physiologiques, il y a plus de canaux ouverts avec la protéine de fusion HCN1-HCN2 qu'avec HCN2 seul. De plus, ces canaux s'activent plus rapidement. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en 2005 par Chen et ses collaborateurs qui avaient démontré que les canaux HCN1-HCN2 génèrent des courants caractérisés par une activation accélérée proche de HCN1. La fusion de HCN1 avec HCN2 permet également de bénéficier de la régulation sympathique de HCN2 (Chen et coll., 2005). Enfin un autre avantage de l'utilisation de ces canaux HCN1-HCN2 est la conservation du phénomène d'hystérèse propre

à HCN1, dont certains travaux permettent d'affirmer qu'il diminue le risque d'arythmies dans les cellules pacemaker (Azene et coll., 2005 ; Mannikko et coll., 2005 ; Elinder et coll., 2006).

L'étude *in vivo* nous a permis de vérifier le gain de fonction apporté par l'utilisation des canaux HCN1-HCN2. En effet, nous avons constaté que dès cinq jours après le BAVc, le rythme d'échappement des souris HCN1-HCN2/ADRB2 est significativement plus rapide que le rythme d'échappement des souris HCN2 de l'étude précédente. Cette différence de rythme atteint son maximum à quinze jours post ablation. L'utilisation de HCN1-HCN2 a donc permis d'améliorer le rythme de nos pacemakers bio-artificiels. Le gain de fréquence chez les souris HCN1-HCN2/ADRB2 est en réalité plus important que ne le reflète nos résultats. En effet, pour cette étude nous avons fait le choix de comptabiliser tous les intervalles RR même en cas de survenue de bigéminismes ventriculaires, liés vraisemblablement à des post-dépolarisations précoces. Le bigéminisme fait partie des arythmies ventriculaires qui surviennent lors des blocs sino-atriaux (Monir et coll., 1999). Cette dépolarisation entraîne une contraction précoce et anormale des ventricules générant ainsi un rythme anormal des ventricules, elle participe néanmoins au rythme d'échappement des ventricules. Les souris *sham* présentent plus fréquemment du bigéminisme (cinq souris sur sept à J20 après le BAVc). Cela s'explique par le rythme d'échappement lent de ces souris. En revanche, la survenue de cette arythmie ventriculaire est diminuée chez les souris HCN1-HCN2/ADRB2 (une souris sur sept du groupe à J20 après le BAVc) et cela grâce au rythme d'échappement plus rapide de ces souris par rapport au rythme idioventriculaire Hissien des souris *sham*.

Notre nouveau pacemaker génère un rythme d'échappement significativement plus rapide dès cinq jours après BAVc alors que pour le pacemaker HCN2/ADRB2, le rythme n'était significativement plus rapide qu'à partir de dix jours post ablation. Ce gain au niveau de la fréquence de ce nouveau pacemaker pourrait nous apporter un bénéfice fonctionnel dès les premiers jours de l'apparition précoce de l'hypertrophie. En effet, une étude réalisée par

notre groupe a situé un remodelage ionique très précoce entraînant le développement rapide de l'hypertrophie dès les douze premières heures après BAVc (Bignolais et coll., 2011). Il serait donc intéressant à l'avenir de vérifier si nous avons une diminution de l'apparition de l'hypertrophie qui serait corrélé avec l'augmentation du rythme de nos souris HCN1-HCN2/ADRB2 et la fonctionnalité plus précoce de ce nouveau pacemaker.

L'utilisation de vecteurs non-viraux nous a permis de nous affranchir des inconvénients pathogènes des virus, permettant ainsi une expression à long terme des transgènes. En effet, des travaux antérieurs du groupe de Bruno Pitard ont montré que le plasmide codant l'érythropoïétine (EPO) injecté à quatre reprises à l'aide d'un vecteur non-viral de la famille des poloxamines à blocs polymères dans le tibia antérieur d'une souris anémiée, avait permis l'expression de l'EPO pendant au moins neuf mois (durée de l'étude) et à des taux permettant de corriger la dysfonction rénale (Richard et coll., 2005). De plus, dans l'étude antérieure de notre groupe avec HCN2, l'expression des transgènes avait pu être vérifiée au moins quarante-cinq jours post-injection (Piron et coll., 2008). Cette fonctionnalité dans le temps du pacemaker bio-artificiel était du même ordre de grandeur que les six semaines du suivi longitudinal de la fonction du pacemaker bio-artificiel créé par implantation de cellules souches mésenchymateuses humaines, préalablement transfectées par HCN2, dans le ventricule gauche de cœur de chien (Plotnikov et coll., 2007).

Un autre avantage des vecteurs non viraux est qu'ils permettent une expression localisée des transgènes en un point unique. Cette expression focale est totalement appropriée à la genèse d'un foyer automatique unique et permet d'éviter ainsi la naissance de plusieurs zones pacemakers qui pourraient être une source potentielle d'arythmies (Piron et coll., 2008). Cette expression localisée avait pu être vérifiée grâce à des expériences d'immunomarquage de la protéine GFP, utilisée comme gène rapporteur dans la précédente étude. Dans notre étude, nous avons essayé sans succès de vérifier l'expression du transgène: plusieurs

techniques d'immunomarquage différentes de HCN1 ont été réalisées en vain. Ceci pourrait s'expliquer par la non-spécificité des anticorps utilisés. Ainsi, lorsque nous avons transfecté des cellules COS-7 avec le plasmide codant pour HCN1-HCN2 afin de réaliser des expériences d'immunofluorescence et des Western Blot, nous n'avions constaté qu'un très faible marquage des cellules transfectés en immunofluorescence et aucun signal n'a pu être mis en évidence par Western Blot. Pour remédier à ce problème, nous envisageons très prochainement d'utiliser une technique d'hybridation *in situ*, ce qui va nous permettre de vérifier la présence des transcrits de notre transgène. Nous allons ainsi nous affranchir des problèmes des anticorps. Ces expériences nous permettront ainsi de terminer cette étude.

En conclusion, notre étude a démontré la faisabilité de générer un pacemaker bio-artificiel dont les rythmes d'échappement sont plus rapides dès cinq jours après BAVc que le rythme du pacemaker HCN2. Ce gain de fréquence apporté par la sous-unité HCN1 de ce canal pourrait permettre un bénéfice fonctionnel lors de l'apparition précoce de l'hypertrophie dans ce modèle pathologique. Ce pacemaker reste toutefois régulé par le système nerveux autonome et cela grâce à la présence de la sous-unité HCN2. Le pacemaker bio-artificiel HCN1-HCN2 remplit les principales attentes d'un pacemaker bio-artificiel, c'est-à-dire la genèse d'une activité automatique et la régulation par le système nerveux. Il serait cependant possible d'améliorer la fonction de ces pacemakers en sur-exprimant d'autres gènes codant pour d'autres canaux faisant partie du programme d'expression des cellules sinusales. De nouvelles stratégies d'optimisation des pacemakers commencent à être expérimentées.

## **PROJET 2 : ETUDE DE LA FAISABILITÉ D'UTILISER LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION TBX3 POUR GÉNÉRER UNE ACTIVITÉ PACEMAKER *IN VITRO*.**

### **I. Introduction**

Depuis quelques années, plusieurs stratégies de thérapie génique ont été proposées dans le but de développer des pacemakers bio-artificiels (Potapova et coll., 2004 ; Miake et coll., 2002 ; Tse et coll., 2006 ; Piron et coll., 2008). Cependant, elles se sont concentrées sur la surexpression d'un ou deux gènes permettant la genèse de l'automatisme. Ce que l'on attend d'un pacemaker bio-artificiel c'est de se substituer au pacemaker physiologique, c'est-à-dire le nœud sinusal, lors des dysfonctions sinusales ou des blocs de la conduction. Le fonctionnement du nœud sinusal dépend de l'expression d'un certain nombre de gènes (Hoogars et coll., 2007). Ces gènes codent pour des canaux ioniques et des jonctions *gap* participant à la genèse et à la propagation de l'influx électrique depuis le centre du nœud sinusal vers le myocarde avoisinant (Mangoni et coll., 2008). L'expression de ces gènes est sous le contrôle de facteurs de transcription tels que Tbx3 qui jouent un rôle important dans la formation du nœud sinusal (Hoogars et coll., 2007 ; Mommersteeg et coll., 2007 ; Christoffels et coll., 2010). Une expression conditionnelle ectopique au niveau atrial de ce facteur de transcription chez des souris transgéniques conduit à la formation de foyers automatiques au niveau atrial (Hoogars et coll., 2007)

Au vu de ces données, nous avons essayé de proposer une nouvelle stratégie pour développer des pacemakers bio-artificiels, basée sur l'utilisation de Tbx3 pour reprogrammer des cellules ventriculaires non automatiques en cellules ayant un phénotype automatique proche des cellules sinusales. Notre premier objectif a été de valider cette approche dans un modèle de cardiomyocytes en culture avant de l'appliquer *in vivo*.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **Isolement des cardiomyocytes néonataux**

Dix-huit à vingt-trois souriceaux de un à trois jours sont sacrifiés par décapitation. Les cœurs sont prélevés puis déposés dans une boîte de Pétri avec du DMEM. Les ventricules sont séparés des oreillettes sous loupe binoculaire puis déposés dans une boîte de Pétri avec du HBSS (Hank's Buffered Salt Solution). Sous hotte de culture, les ventricules sont dilacérés et incubés à 37°C pendant deux minutes avec de la trypsine diluée à 0,25 X dans du PBS (Phosphate Buffer Saline). Après retrait de la trypsine, les tissus dilacérés sont placés délicatement dans un système d'agitation avec 5 ml de solution enzymatique filtrée (collagénase de type II à 175 U/ml et pancréatine solubilisées dans du HBSS). Le système est mis sous agitation dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>, pendant dix minutes. Le surnageant contenant les cardiomyocytes dissociés est prélevé doucement et jeté. Les fragments tissulaires sont resuspendus délicatement avec 5 ml de la solution enzymatique et sont remis en agitation pendant dix minutes dans l'incubateur. Le surnageant est cette fois récupéré dans un tube Falcon de 50 ml avec 1 ml de SVF pour arrêter l'activité enzymatique. Ces cycles de digestion-récupération sont répétés sept fois. Au dernier cycle, les débris tissulaires sont repris avec le reste de la solution enzymatique et sont filtrés sur une membrane en nylon avec des mailles de 42 µm de diamètre. Le tube Falcon de 50 ml avec les cardiomyocytes est centrifugé dix minutes à 600 rpm à température ambiante. Le surnageant est jeté. Les cardiomyocytes sont resuspendus avec du milieu de culture pour cardiomyocytes néonataux (DMEM, 5% de SVF, 10% de sérum de cheval, 1% de pénicilline/streptomycine). Les cardiomyocytes sontensemencés dans trois boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre pendant trente minutes, à 37°C et dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Au cours de ces trente minutes, la grande majorité des fibroblastes adhèrent au fond des boîtes et les cardiomyocytes restent

en suspension. Les cardiomyocytes sont alors récupérés, comptés et ensemencés sur des boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre « coatées » avec de la gélatine 0.1% (Sigma-Aldrich).

Pour les expériences de RT-PCR quantitative, d'immunofluorescence et de FRAP, 500 000 cellules sont ensemencées par boîte. Pour les expériences de Western Blot, 2 000 000 de cellules sont ensemencées.

### **Infection des cardiomyocytes ventriculaire néonataux**

Vingt-quatre heures après ensemencement des cellules, le milieu de culture est remplacé par un milieu (DMEM, 5% de SVF, 10% de sérum de cheval, 1% de pénicilline/streptomycine) contenant les solutions virales. Les aliquots viraux, soit l'adénovirus contenant dans son génome le gène codant le facteur de transcription Tbx3 (Ad-Tbx3, sous contrôle du promoteur CMV) ou l'adénovirus ne contenant aucune cassette d'expression (Ad-Null), sont dilués dans ce milieu préalablement chauffé à 37°C afin que la concentration en particules infectieuses (MOI) soit 50 fois supérieure à la concentration cellulaire présente dans les boîtes de culture. Les cellules contrôles n'étant en contact avec aucun virus, le milieu de départ est remplacé par le milieu d'infection sans virus. Les cellules sont ensuite placées dans une étuve à 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

Le temps de présence des particules virales avec les cellules est fixé à 2 heures. L'interruption de la phase d'infection est réalisée par changement du milieu de culture (DMEM, 5% de SVF, 10% de sérum de cheval, 1% de pénicilline/streptomycine). Les cellules sont ensuite déposées dans une étuve à 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

L'ensemble des adénovirus utilisés lors de ce travail ont été produits par la plateforme de production de vecteurs viraux de l'INSERM U649.

### **RT-PCR quantitative**

Les ARNm des cellules en culture primaire sont extraits à l'aide d'un kit commercial *NucleoSpin®RNA I* (Macherey-Nagel).

Dans le but d'analyser par PCR quantitative la transcription des différents gènes codant pour les protéines impliquées dans l'automatisme cardiaque, une transcription inverse est réalisée avec un kit commercial spécifique (Applied Biosystems). La PCR est réalisée classiquement en quantifiant les produits amplifiés en fin de réaction. Or, à ce stade, les produits réactionnels sont limitants et la quantité de produit amplifié a atteint un plateau, si bien que les quantités détectées ne sont plus proportionnelles aux quantités initiales. La PCR quantitative en temps réel permet de suivre l'accumulation des produits au cours de la phase exponentielle d'amplification. Pour cela, des sondes couplées à un fluorochrome (6-carboxy-fluoresceine) et spécifiques de la séquence cible sont utilisées. A chaque cycle, la quantité d'amplicons double et le niveau de fluorescence augmente en conséquence.

La quantification des ARN est réalisée en calculant le paramètre « Ct ». Celui-ci correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le niveau de fluorescence atteigne un seuil fixé situé dans la phase exponentielle de la courbe. Plus un échantillon possède un nombre de copies initiales élevé de la séquence considérée, plus la valeur Ct sera faible. Pour nos études, nous quantifions les ARN des différents marqueurs par rapport à un gène de référence : HPRT (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase).

Les résultats sont exprimés sous la forme de  $2^{-\Delta CT}$  et représentent l'expression des ARNm cibles par rapport à HPRT (*Livak et Schmittgen, 2001*). Nous avons fait le choix ensuite de normaliser nos résultats par rapport au  $2^{-\Delta CT}$  de la condition contrôle à 24H.

Pour chaque gène, les sondes et les amorces ont été fournies par Applied Biosystems. L'appareil utilisé est le thermocycleur ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Ce



système comprend l'appareil PCR ainsi qu'une caméra détectant la fluorescence qui est pilotée par un ordinateur. Les résultats sont analysés grâce au logiciel SDS 2.1 (Applied Biosystems).

### **Immunofluorescence**

Les immunomarquages ont été réalisés sur les cardiomyocytes en culture sur lamelles de verre. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde 2% pendant 10 min. Les lamelles sont ensuite incubées pendant 45 min dans une solution de saturation et perméabilisation (BSA 4%, Triton X-100 0,4%). Elles sont de nouveau incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-Tbx3 (Santa Cruz, sc-17871) dilué au 1/500 dans une solution de BSA 2%, Triton X-100 0,2%. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution de BSA 2%, Triton X-100 0,2% et éventuellement avec des marqueurs directs tels que la phalloïdine-FITC (marqueur du cytosquelette d'actine; dilué au 1/100<sup>ème</sup>; Sigma) ou le Dapi (1/500; marque les noyaux cellulaires en bleu). Après rinçage rapide à l'eau désionisée, les lamelles, sont montées sur lames de verre avec un milieu de montage (AntiFade ProLong Gold Invitrogen). Les lames sont conservées à l'abri de la lumière avant l'observation. Les cellules sont ensuite observées à l'aide d'un microscope optique équipé pour l'épifluorescence (Axiovert 200M, Carl Zeiss).

## Western Blot

### Extraction protéique

Les cellules sont rapidement lavées trois fois avec du PBS (supplémenté en Calcium et Magnesium) puis sont lysées avec un « *cell scraper* » et un tampon d'extraction contenant 1% de Triton X-100, 100 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mM de NaF, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Roche Applied Science, reference: 837091), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma, dilué au 1:100 (Sigma ; P8340). Les échantillons sont ensuite placés sous agitation pendant 15 min, puis homogénéisés et traités par un sonificateur à 4°C deux fois pendant 5s. Les homogénats sont alors centrifugés pendant 15 min à 15000g à 4°C. Les surnageants sont aliquotés en fonction des besoins ultérieurs. Les culots sont repris dans une solution de SB20 (20% SDS, 10 mM EDTA ; 100 mM de Tris-HCl pH 6,8 ; qsp  $\text{H}_2\text{O}$ ) qui a pour effet de mieux rompre les membranes nucléaires, de resuspendre les culots et d'extraire les protéines restantes. Les aliquots sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### Dosage protéique par la méthode de Lowry

Le surnageant ainsi que les culots protéiques sont dosés par la méthode de Lowry. Cette méthode de dosage par colorimétrie est basée sur la réaction entre le réactif de Folin-Ciocalteu et les résidus tyrosine et tryptophane des liaisons peptidiques, en présence du réactif de Biuret. Le dosage protéique se fait à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad Laboratories) ; 5  $\mu\text{l}$  du lysat cellulaire sont déposés dans une plaque 96 puits auxquels sont ajoutés 25  $\mu\text{l}$  de tampon A' (20  $\mu\text{l}$  de tampon S dilué dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon A ; Biorad Laboratories) et 250  $\mu\text{l}$  de tampon B sensible à la lumière (Biorad Laboratories). On réalise en même temps une

gamme étalon de BSA (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1 et 1,5 µg). Le dosage est ensuite réalisé avec un lecteur de microplaques (VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader, Perkin-Elmer).

### Western Blot

La technique de Western Blot est utilisée afin d'estimer les variations d'expression de protéines. Les lysats cellulaires sont dénaturés 3 min à 95°C dans un tampon composé de 2µl d'agent réducteur NuPAGE Sample Reducing Agent 10X et 5 µl de NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen). Quinze ou 25 µg de protéines sont déposées. Après dénaturation, les échantillons sont chargés sur des gels à gradient NuPAGE 4-12% (Invitrogen). L'extérieur de la cuve est rempli du tampon 1 (40 ml de NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X + 750 ml d'eau déminéralisée) et l'intérieur est rempli de tampon 2 (200 ml de tampon 1 + 500 µl de NuPAGE Antioxydant).

Après 3 heures de migration à 80 Volts constants, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide pendant 1h30 à 150 mA dans un tampon de transfert (pour 2 gels : 15 ml de NuPAGE Transfert Buffer 20X + 60 ml d'éthanol + 300 µl de NuPAGE Antioxydant et 225 ml d'eau déminéralisée). Afin de vérifier l'efficacité de la migration, du transfert et la présence en quantité similaire de protéines sur les membranes, celles-ci sont colorées au rouge Ponceau. Après rinçage au TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,5 mM et Tween 0,1%), la membrane est saturée pendant 1 heure dans du TBS-T lait 5%. Les membranes sont ensuite hybridées avec les différents anticorps primaires dilués dans une solution de TBS-T lait à 5% durant 12 H à 4°C.

Les anticorps primaires sont employés aux dilutions suivantes :

- Tbx3 (Santa Cruz, sc-17871) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture.
- Nav1.5 (Alomone, ASC-005) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture.

- HCN4 (Abcam, ab66501) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture.
- Cx43 (BD Transduction, 610062) : 1/1000 pour les cardiomyocytes en culture.
- GAPDH (Santa Cruz, sc-32233): 1/5000 pour les cardiomyocytes en culture.

Trois lavages sont ensuite réalisés dans du TBS-T puis la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à HRP (HorseRadish Peroxydase) (Santa Cruz) diluée au 1/10000e dans du TBS-T. Après trois rinçages dans du TBS-T lait 5%, la révélation se fait à l'aide du kit de chimioluminescence Western Blot Detection System (Amersham Biosciences) et de l'imager ImageQuant RT ECL (Amersham Biosciences).

Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de la Gapdh. Les quantifications sont faites à l'aide du logiciel ImageJ Software 1.45b (NIH, USA). Nous normalisons ensuite nos résultats par rapport aux conditions contrôles à 24 H.

### **Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)**

#### **Protocole expérimental**

La mesure de la communication jonctionnelle intercellulaire peut être évaluée par la quantification de la cinétique de diffusion d'un fluorochrome au travers des jonctions *gap* grâce à la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment : Gap-FRAP (Wade et coll., 1986).

La charge en fluorochrome des cardiomyocytes néonataux ventriculaires a été réalisée par incubation à 37°C, 15 min, en présence d'une solution de Tyrode (NaCl 144 mM, KCl 5.4mM, HEPES 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3mM, Glucose 10mM, pH 7.4)

contenant du diacétate 6-carboxyfluorescéine (Sigma) 7 µg/ml (DMSO 2%). Trois rinçages successifs sont réalisés pour éliminer toute présence de l'ester de fluorochrome dans le milieu extracellulaire.

L'acquisition des données est réalisée grâce à la station confocale NIKON AIRSI, et le plan de rapprochement est obtenu grâce à l'objectif de x40 S Plan Fluor ELWD DIC.

Une première image de la distribution de la fluorescence, dite de « préblanchiment », est obtenue par un balayage d'une zone prédéfinie avec une exposition à la lumière excitatrice de faible intensité. On sélectionne alors les cellules d'intérêt en les délimitant par des rectangles la cellule que l'on veut photoblanchir, les cellules ou groupes cellulaires en contact avec la cellule à photoblanchir et une ou des cellules isolées qui serviront de témoin. Ces dernières permettent de vérifier qu'il n'y a pas d'évolution de la fluorescence au cours du temps qui pourrait être due soit au photoblanchiment lors des acquisitions successives soit à l'accumulation de la fluorescence liée à la persistance d'ester de fluorochrome dans le milieu extracellulaire malgré les rinçages successifs.

A l'aide du logiciel NIS Element AR3.21, une zone de « Bleach » ou photoblanchiment est sélectionnée, la taille de cette zone ainsi que l'intensité et le temps de « blanchiment » sont réglés et contrôlés par le logiciel et l'expérimentateur pour obtenir une perte de fluorescence qui ne dépasse pas 30 à 40% du niveau de base. Pour les cardiomyocytes ventriculaires le « blanchiment » est obtenu après une forte exposition lumineuse (488 nm, 8mW) de 500 ms dans la zone spécifiée.

Des balayages successifs de la zone choisie sont effectués à intervalles de temps réguliers, avec une exposition à la lumière excitatrice de la même intensité que pour l'obtention de l'image dite de « prébleach ». Le premier balayage est effectué immédiatement après le photoblanchiment, puis une image toutes les 10 secondes est enregistrée pendant 5

minutes. Le logiciel NIS Element AR3.21 permet de quantifier le niveau de fluorescence dans chaque cellule pour chaque image. L'acquisition des données est effectuée à 37°C.

### Calcul de la constante de diffusion k

Dans nos conditions, le retour de fluorescence observé est mono-exponentiel. On considère que les intensités de fluorescences sont proportionnelles aux concentrations en fluorochrome. On a alors :

$$(F_i - F_t)/(F_i - F_0) = e^{-kt}$$

$$\text{soit, } \ln (F_i - F_t)/(F_i - F_0) = -kt$$

**F<sub>i</sub>**, **F<sub>0</sub>** et **F<sub>t</sub>** sont les intensités de fluorescence avant, immédiatement après et au temps t après le photoblanchiment (Peters, 1983 ; Wade et coll., 1986 ; Délèze et coll., 2001). Lorsque l'on exprime le quotient **(F<sub>i</sub>-F<sub>t</sub>)/(F<sub>i</sub>-F<sub>0</sub>)** en coordonnées logarithmiques en fonction du temps, la constante k est alors égale à la pente de la droite obtenue et exprimée en min<sup>-1</sup>.

## xCELLigence

### Principe

Le système xCELLigence, fabriqué par Roche, permet une surveillance en temps réels des changements phénotypiques cellulaires en se basant sur la mesure de l'impédance électrique des cellules déposées dans une plaque 96 puits. Chaque puits est recouvert d'une matrice de microélectrodes d'or qui couvre environ 80% de sa surface. Ces microélectrodes permettent de mesurer les variations d'impédance de la plaque concernée, traduisant les modifications électriques des cellules à tester, et renseignant ainsi sur leur statut biologique (viabilité, nombre, degré d'adhésion, battements). Lorsque les cellules adhèrent et se

répandent sur la surface des puits, il se produit une augmentation de l'impédance électrique (figure 21). L'impédance est affichée comme un paramètre appelé dimension de « *cell index* » (CI), qui est directement proportionnelle à la surface totale couverte par les cellules. Ainsi, le *cellindex* peut être utilisé pour contrôler l'adhésion cellulaire, la diffusion, la morphologie et la densité cellulaire et les battements des cardiomyocytes. Le *cell index*, dérive de l'impédance mesurée selon la formule  $CI = (Z_i - Z_n)/15$ , où  $Z_i$  est l'impédance mesurée à un instant donné et  $Z_n$  l'impédance mesurée au début de chaque expérimentation, lorsqu'il n'y a pas de cellule sur les puits. Lorsque qu'il n'y a aucune cellule sur la plaque de mesure, le CI est proche de 0. Lorsque les cellules adhèrent de manière croissante ou prolifèrent, la valeur du CI augmente. De même, lorsqu'un changement intervient sur le statut cellulaire, comme une modification de morphologie, le CI varie, ce qui nous permet grâce à une vitesse d'acquisition d'un point tous les 12,9 ms d'enregistrer les changements de morphologie des cellules lors des battements des cardiomyocytes néonataux.

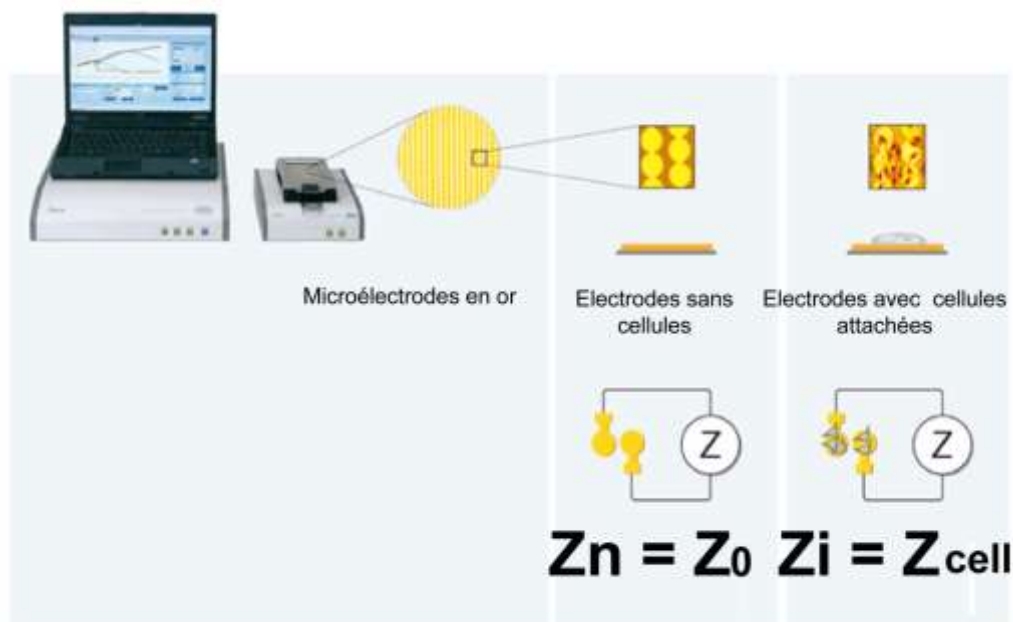
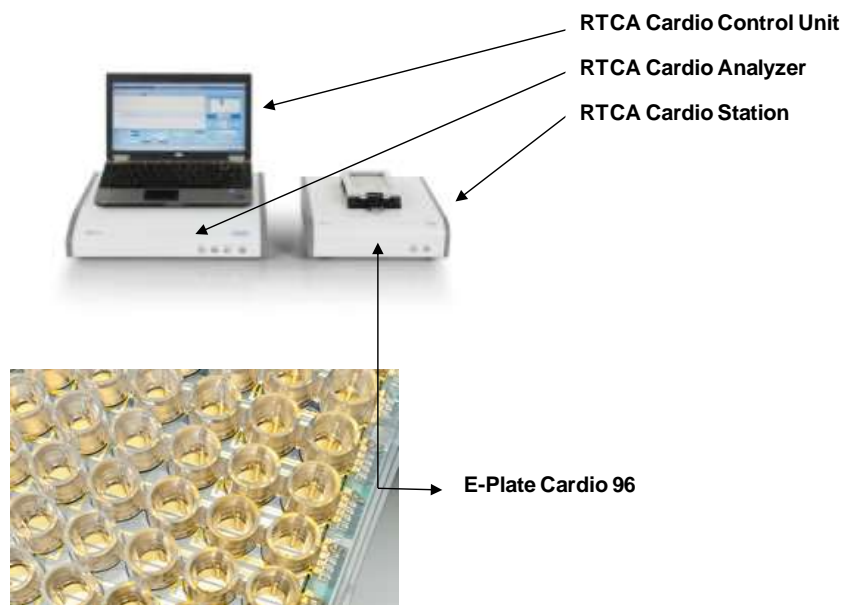


Figure 21 : Schéma illustrant le système XCELLigence et le principe de mesure du cell index.

### Dispositif Expérimental

Le système XCELLigence est composé de (figure 22) :

- l'unité de control RTCA Cardio (Ordinateur) placée en dehors de l'incubateur qui permet d'analyser les données.
- l'analyseur RTCA Cardio, qui permet de traiter ces données et de les transmettre à l'ordinateur.
- la station RTCA Cardio, placée à l'intérieur de l'incubateur à 37°C (5% CO<sub>2</sub>), qui accueille la plaque E-Plate Cardio 96 et permet de recueillir les données.
- la plaque « E-Plate Cardio 96 » est une plaque dont le fond des 96 puits est composé des microélectrodes en or reliée à un capteur cellulaire microélectronique.



**Figure 22 : Les composantes du système RTCA cardio.**

### Protocole Expérimental

Chaque puits de la plaque E-Plate Cardio 96 est 24 heures avant l'ensemencement recouvert de fibronectine (Roche) à 10µg/µL. Les cardiomyocytes sont ensemencés dans



chaque puits au nombre de 110 000. Ce système nécessite un renouvellement du milieu cellulaire 2 fois par jour le temps de l'expérimentation. Les cellules sont infectées 24 H après l'ensemencement.

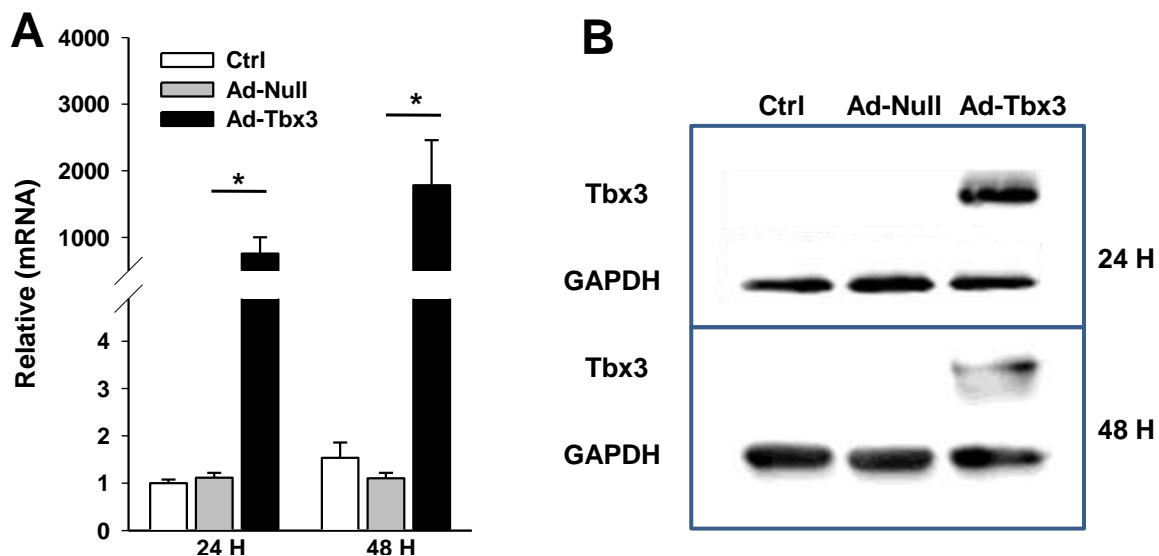
### **Analyses Statistiques**

Les éventuelles modifications d'expression des transcrits, des protéines, de la cinétique de diffusion ainsi que de la fréquence des battements et l'amplitude de contraction entre les différents groupes sont analysées par un Test t de Student non apparié.

### III. Résultats

#### Surexpression de Tbx3 dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux

Afin de vérifier l'expression de Tbx3 dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux, des expériences de RT-PCR quantitative ont été réalisées 24 H et 48 H après l'infection des cardiomyocytes par l'adénovirus codant Tbx3 (Ad-Tbx3). Les résultats nous ont montré une forte expression des transcrits de Tbx3 dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles et infectées avec un virus vide (Ad-Null) (figure 23A).

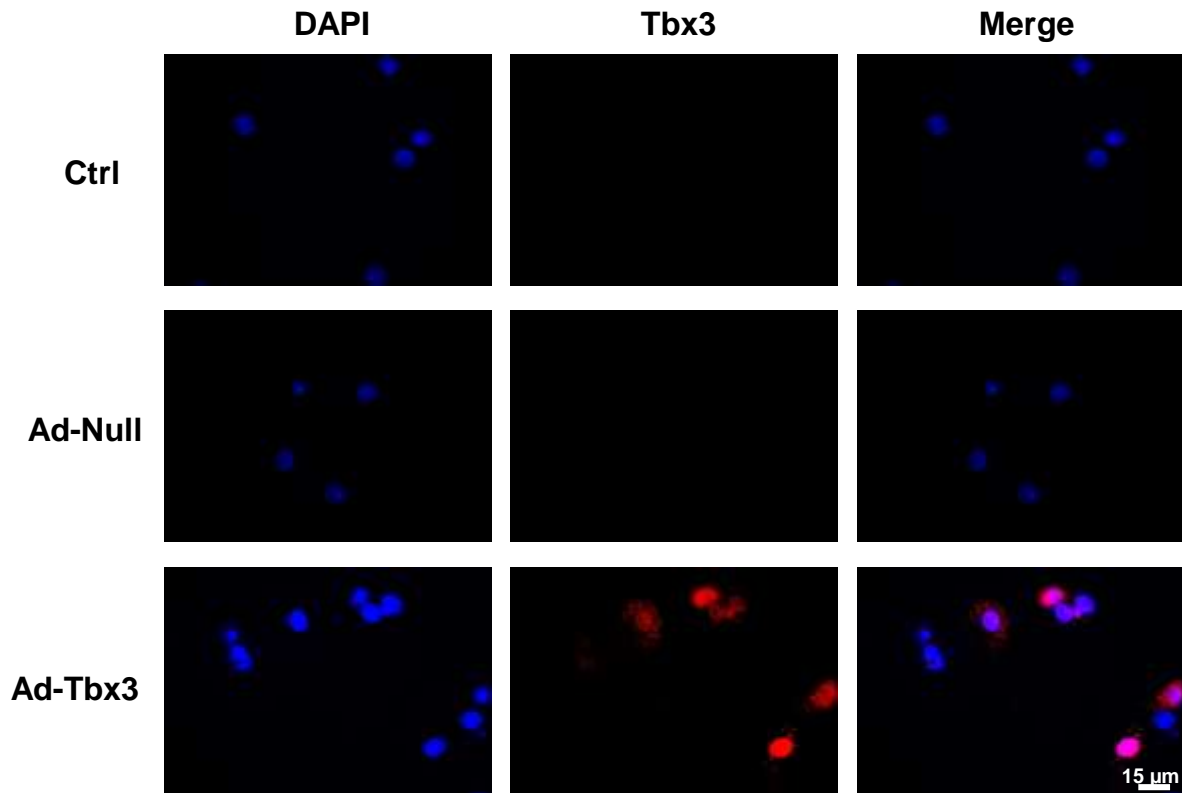


**Figure 23 : Surexpression de Tbx3 dans les cardiomyocytes 24 H et 48 H après infection.**

(A) Quantité relative d'ARNm codant pour le facteur de transcription Tbx3 dans les différentes conditions de culture 24 H et 48 H après infection. \*,  $p < 0,05$  (B) Expression de la protéine Tbx3 dans les cardiomyocytes en culture 24 H et 48 H après infection. Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

Des western blots réalisés avec des dépôts allant de 15 à 25  $\mu\text{g}$  révélés avec l'anticorps polyclonal anti-Tbx3 spécifique de Tbx3 permettent de détecter une bande spécifique à une masse moléculaire apparente de 95 kDa seulement dans les cellules infectées par l'Ad-Tbx3 24 H et 48 H post infection (figure 23B). De plus, les expériences d'immunofluorescence

révèlent un marquage cytoplasmique péri- et intra-nucléaire dans les cellules infectées par l'Ad-Tbx3 (figure 24). Ceci semble correspondre à la phase de synthèse protéique ainsi qu'au transport protéique du cytoplasme vers le noyau. Aucun marquage n'est constaté dans les cellules contrôles et les cellules infectées par l'Ad-Null.



**Figure 24 : Expression du facteur de transcription Tbx3 dans des cardiomyocytes néonataux de souris 48 H après infection.**

Une expression nucléaire du facteur de transcription Tbx3 est observée. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3. Objectif x63.

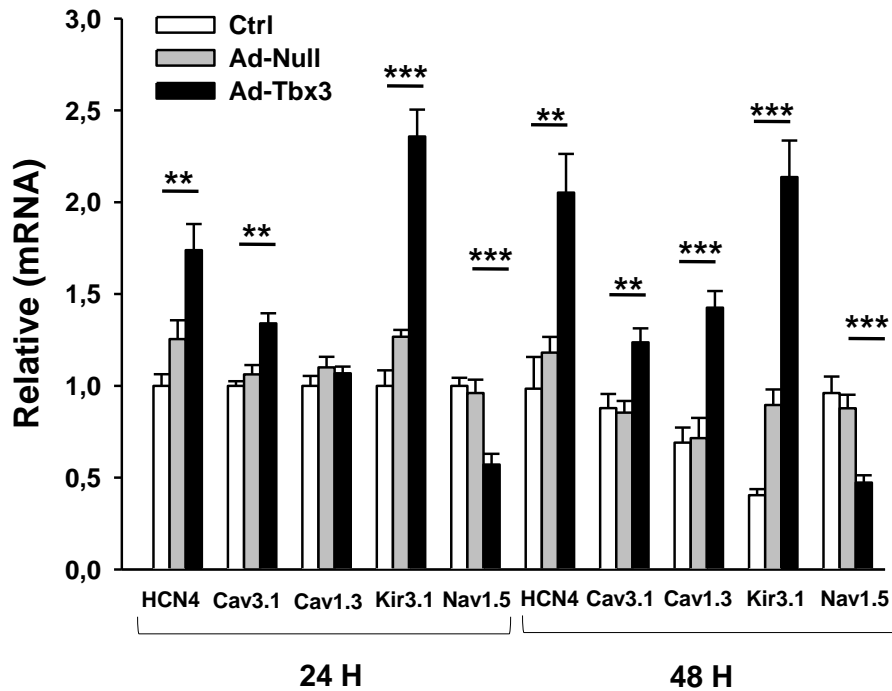
Ces résultats nous ont permis de vérifier que l'infection des cardiomyocytes en culture primaire par un adénovirus codant pour Tbx3 permet de faire exprimer ce dernier dans des cellules qui ne l'expriment pas de manière constitutive. De plus, l'infection par l'Ad-Null ne

modifie pas l'expression endogène de Tbx3 ce qui est essentiel pour la suite des expérimentations.

Afin de s'assurer que l'infection des cardiomyocytes dans ces conditions n'entraîne pas un changement du niveau d'expression de gènes, nous avons vérifié par RT-PCR l'expression du gène GATA4 dans les cultures de cellules non infectés ou infectées avec l'Ad-Null ou l'Ad-Tbx3. Les résultats de PCR quantitative ne montrent aucune variation en fonction des différentes conditions de culture (données non montrées).

### **Conséquences de la surexpression de Tbx3 sur l'expression des canaux ioniques**

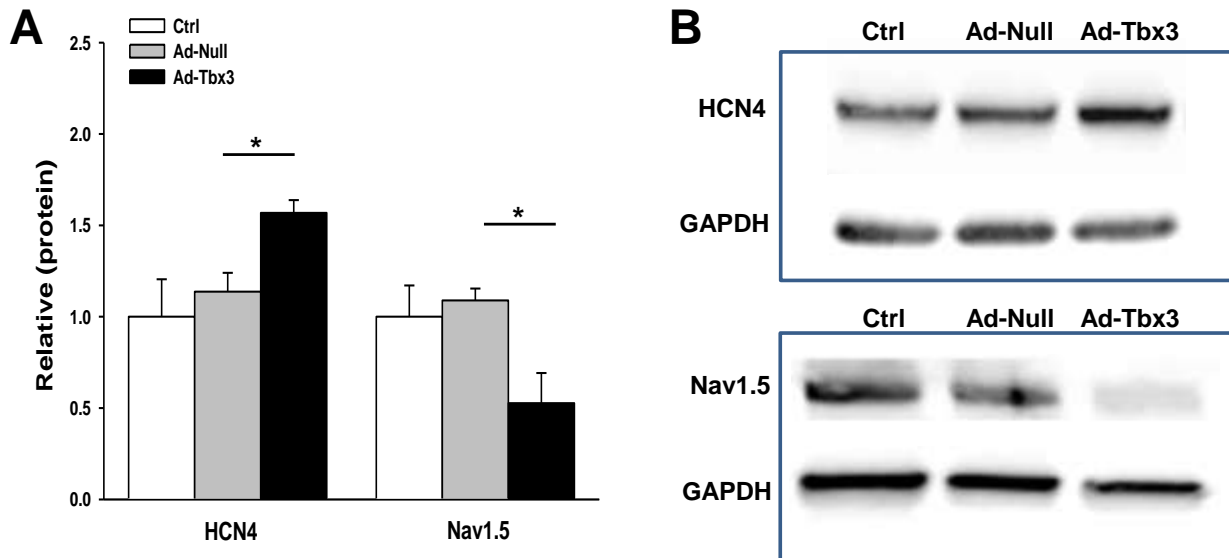
Les expériences de RT-PCR quantitative en temps réel révèlent des changements transcriptionnels des cardiomyocytes 24 H et 48 H après l'infection par l'Ad-Tbx3. A 48 H, les transcrits de gènes codant pour le canal sodique Nav1.5 sont diminués de  $45 \pm 4\%$  dans les cardiomyocytes infectés par l'Ad-Tbx3 ( $n=7$  ;  $p<0,01$ ) par rapport aux cardiomyocytes infectés par l'Ad-Null. Au contraire, nous constatons une augmentation des transcrits du gène *Hcn4* codant pour les canaux pacemakers (de  $76 \pm 19\%$  ;  $n=7$  ;  $p< 0.01$ ), des gènes *Cacna1d* et *Cacna1g* codant respectivement pour les canaux calciques Cav1.3 de type L (de  $128 \pm 36\%$  ;  $n= 7$  ;  $p<0.001$ ) et Cav3.1 de type T (de  $46 \pm 7\%$  ;  $n=7$  ;  $p<0.01$ ) et pour le gène *Kcnj3* codant pour le canal potassique Kir3.1 (de  $140 \pm 14\%$  ;  $n=7$  ;  $p< 0.001$ ) (figure 25). Aucune différence significative n'a été révélée pour les transcrits codant pour les canaux HCN1, HCN2, Kir2.1 et Kir2.2 (données non montrées). Ces résultats nous montrent que la surexpression de Tbx3 induit une surexpression de gènes codant pour des canaux ioniques participant à la genèse des potentiels d'action spontanés dans les cellules sinusales, ainsi qu'une sous-expression du gène codant le canal sodique Nav1.5 exprimé préférentiellement dans les cardiomyocytes du myocarde contractile.



**Figure 25 : Remodelage du niveau d'expression des transcrits des canaux ioniques.**

Expression des ARNm codant pour des canaux ioniques préférentiellement exprimés au niveau sinusal ou au niveau ventriculaire dans des cardiomyocytes 24 H et 48 H après infection. \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ . Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

Suite à ces résultats, nous avons vérifié si ces variations transcriptionnelles pouvaient avoir des conséquences au niveau de l'expression protéique des canaux ioniques. Des expériences de Western Blot ont été réalisées et nous avons ainsi étudié l'expression protéique des canaux HCN4 et Nav1.5 (Figure 26). En ce qui concerne l'expression du canal sodique Nav1.5 nous constatons une diminution de l'expression de la protéine de  $54 \pm 15\%$  à 48 H ( $n=6$ ). Au contraire l'expression de HCN4 est augmentée de  $41 \pm 14\%$  à 48 H ( $n=4$ ) par rapport aux cellules infectés par l'Ad-Null. Ces résultats sont donc corrélés aux variations retrouvées au niveau transcriptionnel lors de la surexpression de Tbx3. L'expression de Tbx3 induit donc un remodelage dans l'expression des canaux ioniques des cardiomyocytes ventriculaires néonataux. Ces cellules ont un profil d'expression des canaux ioniques proche de celui des cellules du nœud sinusal.



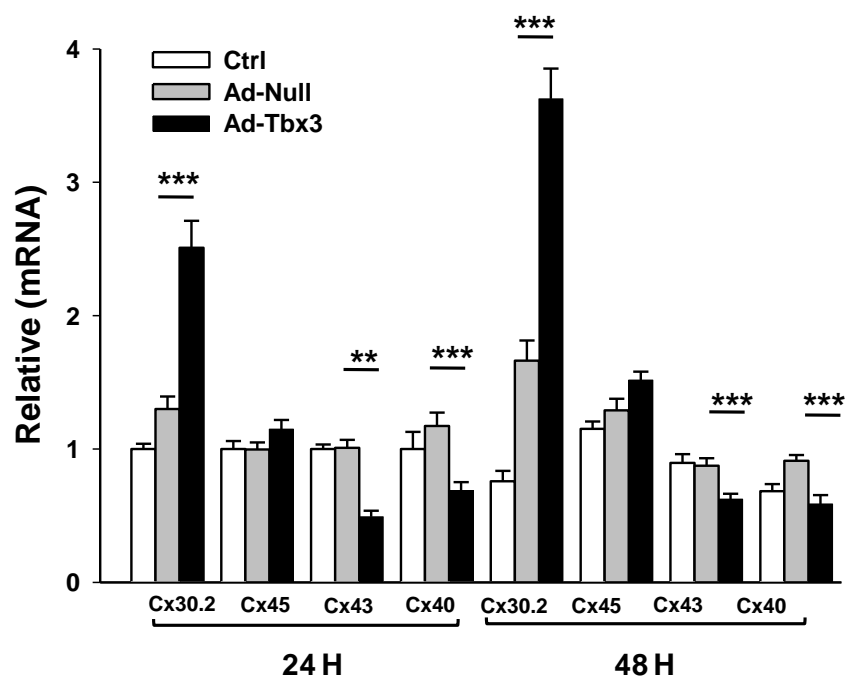
**Figure 26 : Conséquences induites par la surexpression de Tbx3 sur l'expression protéique de Nav1.5 et HCN4.**

(A) Niveau d'expression des protéines HCN4 et Nav1.5 48 H après infection. Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH et par rapport aux niveaux d'expression de base des cardiomyocytes contrôles non infectés. \*,  $p < 0.05$ . (B) Western Blot représentatif obtenu dans les différentes conditions d'infection des cardiomyocytes néonataux 48 H après infection. Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

### Conséquences de la surexpression de Tbx3 sur la conduction intercellulaire

La surexpression de Tbx3 dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux entraîne également une variation de l'expression transcriptionnelle des connexines à 24 H et 48 H après infection (figure 27). Nous constatons lors des expériences de RT-PCR quantitative en temps réel, que l'expression des transcrits codant pour la connexine 43 (Cx43) et la connexine 40 (Cx40) est diminuée respectivement de  $30 \pm 7\%$  et de  $35 \pm 7\%$  ( $n=7$  ;  $p < 0.001$ ) *versus* les cellules infectées par l'Ad-Null. Ces connexines sont caractérisées par une conductance rapide et sont exprimées préférentiellement dans les cardiomyocytes contractiles. A l'inverse l'expression des transcrits codant pour la connexine 30.2 (Cx30.2), de faible conductance et exprimée au niveau de cellules du nœud sinusal, est augmentée de  $132 \pm 29\%$  fois ( $n=7$  ;

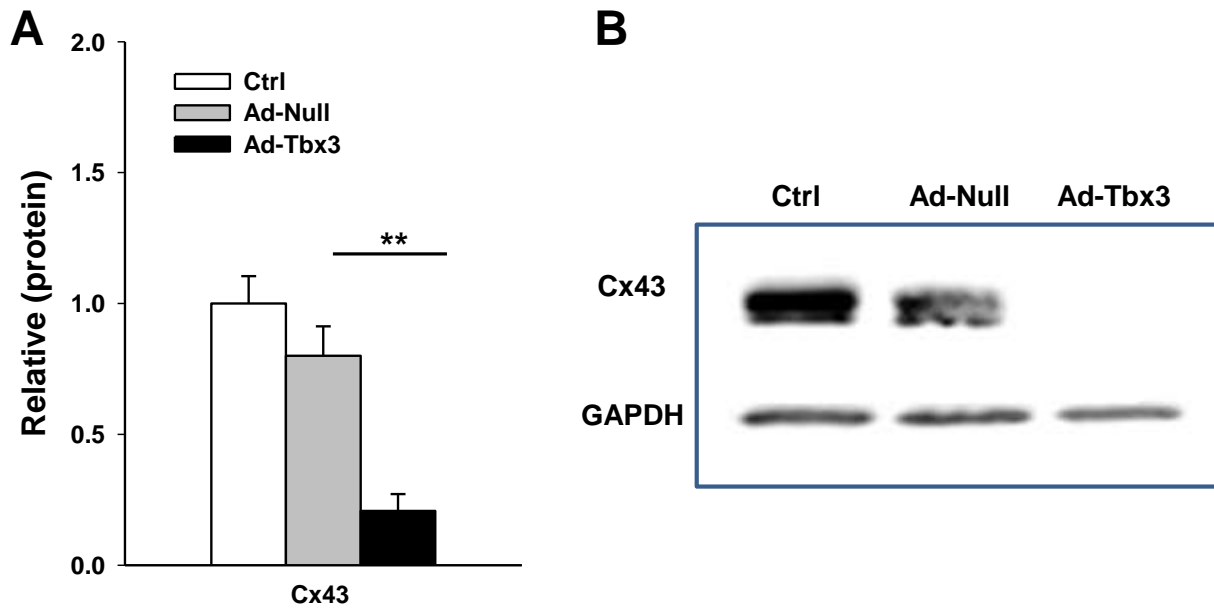
p<0.001) par rapport aux cellules infectées par l'Ad-Null. Nous constatons également une augmentation à 48 H après infection, bien que non significative, de la connexine 45 (Cx45) dans les cellules infectées par l'Ad-Tbx3.



**Figure 27 : Remodelage de l'expression des ARNm codant pour les connexines cardiaques.**

Expression des transcrits codant pour les connexines exprimées au niveau sinusal et au niveau ventriculaire dans les différentes conditions d'infection des cardiomyocytes 24 H et 48 H après infection. \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001. Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

L'expression protéique de la Cx43 est également diminuée de  $67 \pm 12\%$  (n=5) dans les cardiomyocytes infectés par l'Ad-Tbx3. Des expériences de western blot nous montrent une diminution de l'expression de cette protéine par rapport aux cellules infectées par l'Ad-Null (figure 28).



**Figure 28 : Expression de la connexine 43 dans les cardiomyocytes néonataux 48 h après infection.**

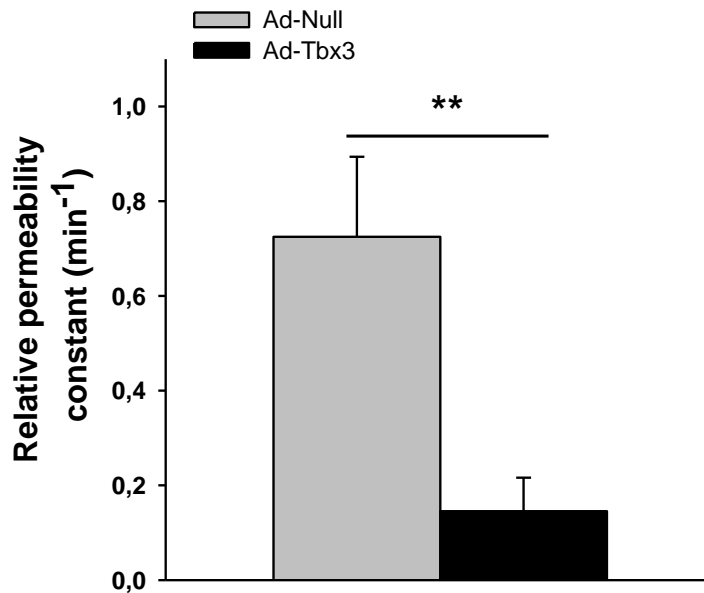
(A) Niveau d'expression de la Cx43 48 H après infection. Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH et par rapport au niveau d'expression de base des cardiomyocytes contrôles (non infectés). \*\*  $p < 0.01$ . (B) Western Blot représentatif obtenu dans les différentes conditions d'infection des cardiomyocytes néonataux 48 H. Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que la surexpression de Tbx3 conduit également à un remodelage de l'expression des connexines en diminuant l'expression des connexines préférentiellement exprimées dans les cardiomyocytes contractiles et en augmentant l'expression des connexines exprimées dans les cellules sinusales. Suite à ces résultats nous avons vérifié si ce remodelage pouvait conduire à un changement du couplage des cellules infectées par l'Ad-Tbx3.

Les effets fonctionnels du remodelage des connexines ont été étudiés par la mesure de la cinétique de la diffusion de cellule à cellule d'un colorant fluorescent dans les cardiomyocytes néonataux ventriculaires au moyen de la technique de Gap-FRAP (Délèze et coll., 2001). Les résultats préliminaires (figure 29) relèvent une cinétique de diffusion du fluorochrome (K) de cellule à cellule par les jonctions *gap* de  $0,13 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  ( $n=7$ ) dans les



cellules infectées par l'Ad-Tbx3 alors que dans les cellules infectées par l'Ad-Null, K est estimé à  $0,72 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$  (n=10 ; p<0,01). Nous constatons grâce à ces résultats que la surexpression de Tbx3 a pour conséquence une diminution du couplage jonctionnel des cellules.



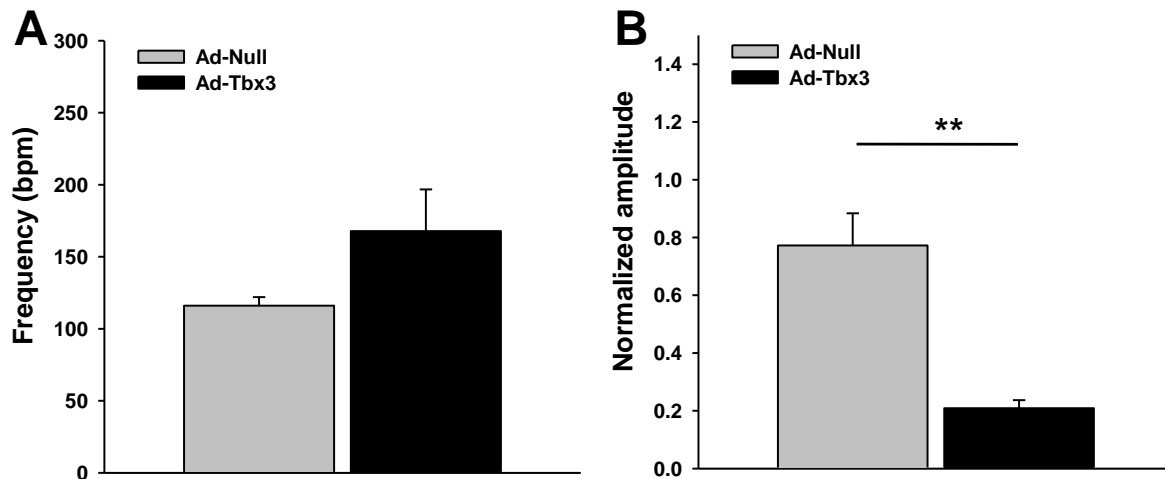
**Figure 29 : Conséquences induites par la surexpression de Tbx3 sur le couplage intercellulaire.**

La surexpression de Tbx3 provoque une forte diminution de la cinétique de diffusion des jonctions *gap*. p<0,01. Ctrl : cellules non infectées ; Ad-Null : cellules infectées avec un adénovirus ne codant pour aucune cassette d'expression ; Ad-Tbx3 : cellules infectées par avec un adénovirus codant pour le facteur de transcription Tbx3.

### Conséquences de la surexpression de Tbx3 sur le phénotype contractile des cardiomyocytes

Le système XCelligence nous a permis d'enregistrer la fréquence des battements et de caractériser la contraction de ces cellules infectées. Les résultats préliminaires ne montrent qu'une faible augmentation significative de la fréquence de battements des cellules infectées par l'Ad-Tbx3 par rapport aux cellules infectées par l'Ad-Null (figure 30A). Cependant lors

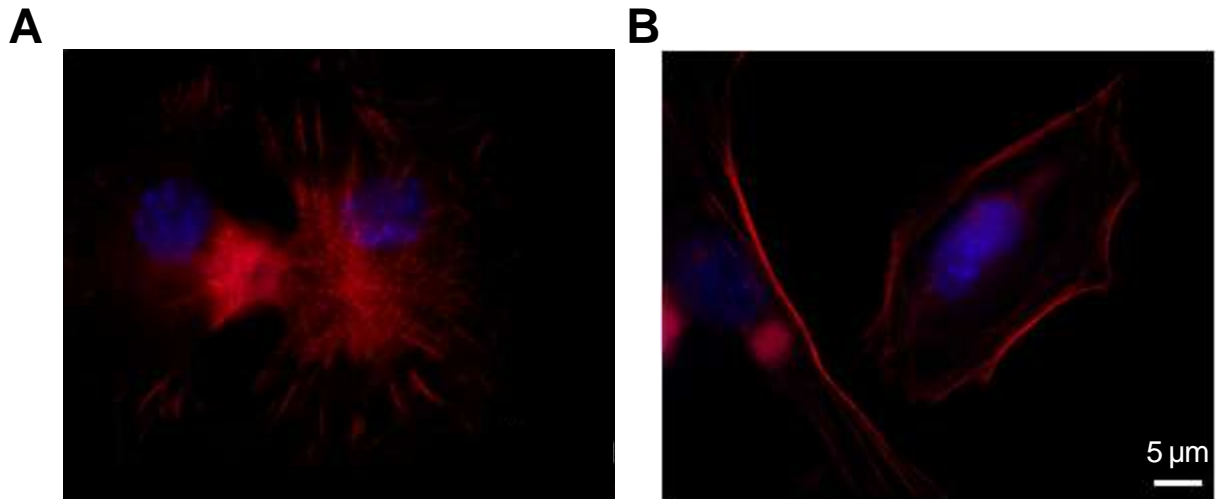
de la caractérisation de la contraction, nous constatons une diminution significative de l'amplitude de contraction dans les cardiomyocytes infectés par l'Ad-Tbx3 de  $68 \pm 8\%$  par rapport à l'amplitude de contraction des cardiomyocytes infectés par l'Ad-Null (figure 30B).



**Figure 30 : Phénotype contractile des cardiomyocytes néonataux 48 H après infection.**

(A) Fréquence de battements des cardiomyocytes infectés par l'Ad-Null ou par l'Ad-Tbx3 48 H après infection. (B) Amplitude des battements des cardiomyocytes infectés. Les données sont normalisées par rapport à la valeur de l'amplitude de battement de chaque puits avant l'infection.  $p < 0,01$ .

Afin de comprendre la diminution de l'amplitude de contraction des cardiomyocytes surexprimant Tbx3, nous avons commencé à étudier l'expression des protéines contractiles et de structure. Des expériences d'immunomarquage à la phalloïdine nous ont permis de visualiser l'organisation de l'actine (figure 31). Nous constatons une organisation différente de l'actine dans les cellules surexprimant le facteur de transcription Tbx3. Le réseau d'actine semble moins développé, moins strié et l'actine est majoritairement corticale dans cette condition par rapport aux cellules infectées par l'Ad-Null. Cette déstructuration de l'organisation de l'actine pourrait altérer l'appareil contractile des cardiomyocytes infectés par l'Ad-Tbx3.



**Figure 31 : Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine.**

(A) Immunofluorescence de la phalloïdine dans les cardiomyocytes néonataux en culture 48 H après l'infection par l'Ad-Null. (B) Immunofluorescence de la phalloïdine dans les cardiomyocytes néonataux en culture 48 H après l'infection par l'Ad-Tbx3. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). Objectif x63.

#### **IV. Discussion**

Cette étude propose une nouvelle approche de développement de pacemakers bio-artificiels. Cette approche est basée sur l'utilisation de facteurs de transcription permettant la reprogrammation des cellules du myocarde contractile en cellules avec un phénotype sinusal. L'avantage de cette approche est qu'elle permet l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la genèse spontanée et la conduction de l'influx électrique. Une étude réalisée récemment prouve la faisabilité de ce concept. Le facteur GATA-6 a été utilisé pour reprogrammer des mésangioblastes. Ces cellules, une fois différenciées, exprimaient le canal HCN4 et la Cx45 et présentaient des potentiels d'action spontanés (Barbuti et coll., 2010).

Sur la base des travaux d'Hoogaars et ses collaborateurs, nous avons fait le choix d'utiliser le facteur de transcription Tbx3. Ces travaux ont démontré que ce facteur de transcription est impliqué dans le maintien du programme d'expression de gènes du nœud sinusal. De plus, la surexpression de Tbx3 au niveau auriculaire dans un modèle de souris transgéniques conduit à la formation de foyers ectopiques (Hoogars et coll., 2007). Basé sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'il était donc possible d'utiliser ce facteur de transcription pour développer des pacemakers bio-artificiels cardiaques. Notre objectif était donc de reprogrammer des cellules ventriculaires contractiles non automatiques en cardiomyocytes automatiques.

Pour valider cette hypothèse, nous avons décidé dans un premier temps de réaliser une étude *in vitro*. Nous avons choisi de travailler avec des cardiomyocytes ventriculaires néonataux de souris. Ces cardiomyocytes sont facilement obtenus par une technique d'isolement cellulaire. La quantité de cellules obtenues (plus de quatorze millions) ainsi que leur maintien en culture jusqu'à plus de trois jours de culture nous permettent de réaliser aisément nos expériences de RT-PCR et de biochimie. Toutefois, ces cellules sont

difficilement transfectables. Face à cette difficulté, nous avons opté pour l'utilisation d'un adénovirus portant le gène codant pour Tbx3.

L'infection des cardiomyocytes ventriculaires néonataux par l'Ad-Tbx3 a été réalisée selon un protocole mis au point à partir d'adénovirus codant pour la GFP. Par une approche d'épifluorescence et de cytométrie en flux, nous avons observé qu'un taux d'infection (MOI) de 50 particules virales par cellule permettait d'infecter au moins 90% des cardiomyocytes (données non présentées). Nos immunomarquages nous ont permis de vérifier le taux d'infection obtenu par l'Ad-GFP et l'expression de Tbx3 dans ces conditions d'infection. Ces marquages montraient également une localisation nucléaire de Tbx3 dans les cardiomyocytes infectés. La surexpression de l'ARNm codant pour ce facteur de transcription ainsi que de la protéine Tbx3 sont en corrélation avec les résultats d'immunofluorescence.

Pour la suite de notre étude, nous nous sommes assurés que l'infection des cardiomyocytes dans ces conditions n'entraînait pas de changement du niveau d'expression de gènes contrôlant le phénotype cardiaque. Pour cela, nous avons vérifié par RT-PCR l'expression du gène GATA4 dans nos différentes conditions d'infection. Le facteur de transcription GATA4 est exprimé dans la phase précoce de différenciation des cardiomyocytes. Une mutation ou une variation de l'expression de ce gène peut entraîner une dérégulation de l'expression de nombreux gènes dérégulant ainsi la fonction cardiaque (Pikkarainen et coll., 2004). L'infection par l'adénovirus codant Tbx3 n'a pas eu de conséquence sur l'expression de ce gène.

Nous avons constaté que la surexpression de Tbx3 conduit à une surexpression de gènes codant pour les canaux ioniques impliqués dans l'automatisme des cellules du nœud sinusal. En effet, nous avons obtenu une augmentation des transcrits codant pour le canal pacemaker HCN4, isoforme majoritaire dans le nœud sinusal (Marionneau et coll., 2005), pour les canaux calciques Cav1.3 de type L et Cav3.1 de type T, fortement exprimés dans les

cellules automatiques du nœud sinusal et des cellules du nœud AV (Hagiwara et coll., 1988 ; Protas et coll., 2001 ; Yuill et coll., 2002), et pour le canal Kir3.1, générant le courant  $K^+$  activé par l'acétylcholine et exprimé au niveau du nœud sinusal (Lomax et coll., 2003). Au contraire, l'expression du gène *Scn5a*, codant pour les canaux Nav1.5 responsables du courant sodique et très fortement exprimé au niveau ventriculaire, est diminuée.

Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Hoogaars et ses collaborateurs en 2007. Toutefois, pour certains gènes nos résultats sont en contradiction avec cette étude. En effet, ces auteurs avaient montré une surexpression dans les oreillettes des transcrits codant pour les canaux pacemakers HCN1 et HCN2 alors que notre étude ne montre pas de variation significative de l'expression de ces gènes. L'étude de Hoogaars montre également une sous expression des gènes codant pour les canaux Kir2.1 et Kir 2.2, qui génèrent le courant  $I_{K1}$  permettant le maintien du potentiel de repos des cellules contractiles, alors que nos résultats ne montrent aucune variation des transcrits de ces gènes. Cette incohérence au niveau des résultats obtenus pourraient s'expliquer par une différence basale d'expression des gènes entre les oreillettes et les ventricules et les conditions environnementales différentes, puisque nous travaillons dans un modèle *in vitro*, contrairement à l'étude de Hoogaars.

La Cx43 est exprimée dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, contractiles et conducteurs. Elle n'est cependant détectée ni dans les tissus nodaux (nœud sinusal et nœud AV), ni dans le faisceau de His et les régions proximales de ses branches (Hervé et coll., 2008). La connexine 40 est quant à elle exprimée dans le tissu auriculaire et le tissu conducteur ventriculaire (Miquerol et coll., 2004) L'expression des connexines de faible conductance (Cx45, Cx30.2, Cx30) dans le nœud sinusal est responsable du faible couplage entre les cellules ce qui limite l'hyperpolarisation induite par les cellules atriales favorisant ainsi l'émergence de l'activité automatique (Mangoni et Nargeot, 2008 ; Christoffels et coll., 2010). A l'inverse, l'expression myocardique de connexines de haute conductance permet un

bon couplage entre les cellules et une conduction rapide de l'influx électrique, permettant ainsi une contraction coordonnée du myocarde. Lorsque nous avons surexprimé Tbx3, nous avons constaté une diminution de l'expression de la Cx43 et de la Cx40, ainsi qu'une surexpression de la Cx30.2. Nos résultats démontrent également une surexpression, bien que non significative, de la Cx45. Tbx3 semble se fixer directement sur une séquence TBE du promoteur du gène de la Cx43. Cette action ne peut se faire que via son interaction avec d'autres facteurs à homéobox, Msx1, Msx2 (Boogerd et coll., 2008). Au niveau fonctionnel, nos résultats préliminaires de FRAP nous démontrent une diminution du couplage intercellulaire dans les cellules infectées par l'Ad-Tbx3. Nous avons donc un changement du fonctionnement des jonctions *gap* et du couplage des cellules surexprimant Tbx3.

Les résultats préliminaires obtenus grâce au système xCelligence RTCA-cardio ne semblent pas relever de différence de fréquence de battement des cardiomyocytes infectés par Tbx3 par rapport à ceux infectés par l'Ad-Null 48 H après l'infection. Nous ne pouvons pas conclure pour l'instant au vu du faible nombre de cultures présentant une contraction synchronisée des cardiomyocytes avant l'infection. Cependant, à 48 H après l'infection, nous avons pu constater une différence significative de l'amplitude de contraction des cardiomyocytes infectés par l'Ad-Tbx3 par rapport à ceux infectés par l'Ad-Null (n=8, 2 isollements différents). Ce résultat pourrait s'expliquer, du moins en partie, par une désorganisation des protéines contractiles. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'actine des cardiomyocytes surexprimant Tbx3 n'est plus organisée sous forme de sarcomère, mais semble avoir une expression corticale. Cette organisation différente pourrait conduire à un changement des propriétés contractiles d'où la diminution de l'amplitude de contraction constatée. Les cellules sinusales ont un phénotype peu contractile par rapport aux cardiomyocytes contractiles ventriculaires. Pour la suite de ce projet, nous allons étudier

l'expression d'autres protéines contractiles afin de mieux caractériser le phénotype contractile des cardiomyocytes surexprimant Tbx3.

Notre étude a donc démontré que la surexpression du facteur de transcription Tbx3 peut conduire à un changement *in vitro* du phénotype de cellules ventriculaires pour un phénotype automatique. Avant de passer aux expériences *in vivo*, nous allons caractériser le profil électrophysiologique des cellules.

Une limite de notre étude est qu'elle a été réalisée avec des cardiomyocytes ventriculaires néonataux en culture. Pour valider ces résultats, nous pourrions envisager de réaliser une étude en parallèle avec des cardiomyocytes adultes en culture. Les différences d'expression des gènes entre les cardiomyocytes néonataux et les cardiomyocytes adultes pourraient aboutir à des résultats différents. Toutefois, les cardiomyocytes adultes en culture ne semblent pas être le modèle cellulaire le plus approprié. En effet une dédifférentiation de ces cellules en culture vers un phénotype sinusal a été décrite, avec une augmentation significative dès 4 jours de culture du courant de pacemaker  $I_f$  (Farès et coll., 1998).

Au vu de nos résultats obtenus avec les cardiomyocytes néonataux, la faisabilité d'utiliser le facteur Tbx3 pour développer des pacemakers ventriculaires bio-artificiels semble réalisable. Cependant, la répression directe de Tbx3 par le facteur de transcription Nkx2.5, exprimé fortement au niveau ventriculaire, pourrait être un frein à la reprogrammation *in vivo* de cellules ventriculaires. En effet, l'inhibition du facteur natriurétique atrial (Nppa) au niveau atrial se fait par la dimérisation de Tbx3 par Nkx2.5 (qui se fixe sur une séquence NKE) (Hoogars et coll., 2004).

Un autre facteur de transcription, Shox2, semble être un gène candidat pour induire la reprogrammation des cardiomyocytes ventriculaires et pouvoir ainsi s'affranchir de l'inhibition de Nkx2.5. Des souris invalidées pour le gène Shox2 présentent une surexpression



de Nkx2.5, de la Cx40 et de la Cx43, alors que Tbx3 et HCN4 sont sous-exprimés (Blaschke et coll., 2007 ; Espinoza-Lewis et coll., 2009 et 2011). Toutefois, Shox2 ne peut à lui seul assurer la formation du nœud sinusal. En effet, une surexpression conditionnelle de Shox2 pendant le stade embryonnaire, dans l'ensemble du cœur des souris transgéniques ne permet pas l'apparition de foyers automatiques ectopiques, ni l'expression ectopique de marqueurs du nœud sinusal tels que Tbx3 et HCN4 (Espinoza-Lewis et coll., 2011). Il semble donc opportun d'étudier les conséquences d'une co-expression de Shox2 et Tbx3 dans notre modèle cellulaire dans le but d'accentuer la reprogrammation du phénotype ventriculaire de ces cellules vers un phénotype automatique sinusal.

## **DISCUSSION GENERALE**

Dans ce travail, nous avons proposé deux approches différentes afin de développer des pacemakers bio-artificiels.

La première étude avait pour objectif d'optimiser les pacemakers bio-artificiels développés préalablement dans l'équipe. Nous avons pour cela transférer, à l'aide de vecteurs non-viraux, un gène permettant de générer une activité automatique dans le ventricule gauche de souris en bloc AV. Les gènes que nous avons choisi de transférer sont les gènes codant pour un canal HCN et pour le récepteur  $\beta_2$ .

Les canaux HCN sont principalement exprimés dans l'ensemble des cellules douées d'une activité automatique (Baruscotti et coll., 2005). Plusieurs études ont proposé que le courant  $I_f$ , généré par les canaux HCN, soit essentiel au déclenchement de l'activité automatique cardiaque (DiFrancesco, 2006).  $I_f$  semble jouer un rôle primordial puisque plusieurs études ont démontré qu'au cours du développement puis du vieillissement, la diminution du rythme cardiaque est corrélée à une diminution de l'expression des canaux HCN. En effet, une étude a révélé que le niveau d'expression des transcrits HCN2 et HCN4 diminuait au cours du développement (Huang et coll., 2007). Ces résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment par Accili et ses collaborateurs qui démontraient qu'entre des myocytes isolés du nœud sinusal de lapins nouveau-nés et adultes, la densité de  $I_f$  est une fois et demie plus importante dans les myocytes néonataux (Accili et coll., 1997). Le ralentissement de l'activité sinusale au cours du développement et du vieillissement serait donc lié à une diminution d' $I_f$ . D'autre part, une seconde équipe a démontré que la diminution d' $I_f$  au cours du développement pouvait être secondaire à une diminution marquée du taux d'AMPC dans les cellules sinusales (Yang et coll., 2006). Il est donc probable que la diminution de  $I_f$  au cours du développement et du vieillissement ne soit pas seulement due à

une diminution de l'expression des transcrits. Cependant, il n'en reste pas moins que les messagers de HCN2 et HCN4 sont progressivement (Huang et coll., 2007) diminués au cours du vieillissement. De plus, les canaux HCN semblent être les candidats les plus appropriés à l'initiation d'un automatisme au sein de cellules quiescentes (Michels et coll., 2005). Ces travaux ont conforté notre choix de surexprimer les gènes HCN dans l'optique de créer une activité automatique dans les cellules ventriculaires.

La surexpression du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique est également pertinente. Ce récepteur est connu pour activer, via l'AMPc, préférentiellement les canaux HCN et augmenter ainsi le courant pacemaker généré (Graf et coll., 2001). De plus, il a été démontré, dans une étude antérieure de notre équipe, que l'expression du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique avec les canaux HCN permet d'optimiser le gain de rythme ventriculaire du pacemaker bio-artificiel créé grâce à la co-transfection de ces gènes (Piron et coll., 2008).

Notre première stratégie d'utiliser la protéine de fusion HCN1-HCN2 et le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique semblait donc être la plus appropriée pour développer une zone d'activité automatique, puisque le courant ainsi généré se caractérise par une activation accélérée proche de celle de HCN1, tout en conservant une régulation sympathique similaire à celle de HCN2. Notons également que dans notre étude aucun épisode de tachycardie ventriculaire n'a été remarqué chez les souris injectées avec HCN1-HCN2. L'utilisation de cette protéine de fusion a donc permis d'augmenter efficacement le rythme ventriculaire des pacemakers. Ce gain de fonction pourrait réduire, voire stopper, le phénomène d'hypertrophie ou du moins celui de l'insuffisance cardiaque survenant lors de la première étude avec l'utilisation de HCN2. (Piron et coll., 2008).

Notre deuxième stratégie, utilisant le facteur de transcription Tbx3, semble être une alternative efficace pour créer des pacemakers bio-artificiels. En effet, la surexpression de Tbx3 permet non seulement de modifier l'expression des canaux HCN mais également

d'autres canaux et connexines participant à l'automatisme cardiaque et à la propagation de l'activité électrique dans le nœud sinusal. Nos résultats sont plutôt encourageants. Il nous reste à vérifier si la surexpression de *Tbx3 in vivo* au niveau ventriculaire, grâce aux vecteurs non viraux, est capable de générer une fonction pacemaker efficace et modulable par le système nerveux autonome.

Grâce aux études réalisées au sein de notre laboratoire, notre modèle de création d'un pacemaker bio-artificiel par transfert de gènes dans des modèles expérimentaux animaux apparaît donc faisable (à court terme). Ces approches méritent tout de même d'être validées dans des modèles animaux plus proches de l'homme et dans des études à long terme.

Nous espérons qu'avec une des deux stratégies proposées dans ce travail, nous pourrions créer un pacemaker bio-artificiel dont le rythme sera suffisamment rapide pour être en mesure de réduire voire de stopper le phénomène d'hypertrophie consécutif au bloc AV (ou du moins celui de l'insuffisance cardiaque) et prolonger ainsi la survie des animaux.

La thérapie génique utilisant des agents transfectants non-viraux nous semble être la stratégie la plus prometteuse pour la création d'un pacemaker bio-artificiel cardiaque. En effet, l'injection intramyocardique du complexe gène-vecteur non viral conduit à une expression focalisée automatique (Piron et coll., 2008) appropriée à l'objectif de générer un foyer automatique unique. Les vecteurs viraux ont un pouvoir de diffusion plus important que les vecteurs non-viraux et un pouvoir de réplication qui pourrait conduire à l'émergence de plusieurs foyers automatiques. L'existence de multiples foyers automatiques peut être susceptible d'engendrer des troubles du rythme du fait de la compétition entre eux. Un autre avantage des vecteurs non viraux est leur capacité à co-transfecter plusieurs plasmides d'expression, dont la taille en Kb peut être plus importante que pour les virus. Un exemple précis de leur capacité est apporté par l'étude de Richard et ses collaborateurs dans laquelle le plasmide contenant l'ADNc de la dystrophine 16,1 kb a pu être transfecté dans les cellules

musculaires squelettiques (Richard et coll., 2005). Cet avantage nous a permis de transférer plusieurs plasmides d'expression de grande taille codant pour des protéines qui nous permettent d'améliorer et de réguler l'efficacité de nos pacemakers.

A l'heure actuelle, et à notre connaissance, aucune stratégie cellulaire n'a permis de créer un pacemaker bio-artificiel cardiaque plus efficace que ceux obtenus par transfert génique. L'avantage de la thérapie génique permet de modifier des cellules déjà présentes au sein du tissu cible. Ces cellules sont donc déjà couplées aux cellules avoisinantes, ce qui facilite probablement la propagation de l'impulsion électrique automatique des cellules dans lesquelles le ou les transgènes sont exprimés vers ceux dont la fonction originelle est conservée. Au contraire, l'approche cellulaire nécessite un couplage hétérogène entre les cellules injectées et les cellules avoisinantes. Bien que la voie cellulaire permette de se passer des vecteurs viraux, l'utilisation des cellules présente de nombreuses limites telles que la provenance de ces cellules, leur purification, le risque de différenciation, la question de l'intégration avec les cellules hôtes, la réponse immunitaire, leur durée de survie après injection, et leur potentiel proarythmique et néoplasique. Finalement, le choix des vecteurs non-viraux permet de contourner les problèmes inhérents aux vecteurs viraux, et dans ce cas, les cellules souches perdent leur principal avantage non pathogène sur la thérapie génique. Cependant, dans le cas des pathologies de la conduction AV, régénérer un tissu de conduction entre les oreillettes et les ventricules par thérapie cellulaire semble plus approprié que la création d'un pacemaker bio-artificiel ventriculaire, qui serait désynchronisé du rythme sinusal. Les stimulateurs électroniques double-chambre implantés lors de la survenue de cette pathologie permettent de synchroniser le rythme entre les oreillettes et les ventricules.

En revanche, lors de dysfonctions sinusales, l'intérêt de développer un pacemaker bio-artificiel prend tout son sens. Le nœud sinusal étant défaillant nous pouvons espérer créer un pacemaker dont le rythme plus rapide serait capable de s'imposer face au rythme sinusal

beaucoup trop lent. Pour espérer stimuler efficacement l'ensemble du cœur et de manière synchronisée, il est préférable de créer le pacemaker au sein même des oreillettes. Notre zone d'injection dans notre modèle animal n'est évidemment pas la plus appropriée, mais dans le cas du modèle murin il est difficile techniquement d'envisager une autre zone d'injection. Une perspective de cette étude est de réaliser une étude dans un modèle animal plus grand ce qui nous permettra de localiser la meilleur zone de création de ce pacemaker bio-artificiel.

Il apparaît donc essentiel qu'avant d'envisager une application clinique des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les stratégies et les méthodes les plus performantes et les plus pertinentes en vue de créer un pacemaker bio-artificiel efficace à long terme et sans aucun risque secondaire. Malheureusement à l'heure actuelle, il existe encore trop d'inconvénients tant dans l'approche cellulaire que dans l'approche génique, dont le principal est bien sûr l'expression transitoire du transgène. Il reste donc à élargir la compréhension préclinique afin de déterminer si le pacemaker bio-artificiel se rapprochera à terme de la fiabilité, de la longévité et de l'efficacité qu'offrent à l'heure actuelle les stimulateurs électroniques. Plusieurs hypothèses laissent maintenant envisager que le pacemaker bio-artificiel pourrait être complémentaire au stimulateur électronique. Des études ont d'ailleurs démontré que le pacemaker bio-artificiel pouvait réduire la dépendance au stimulateur électronique, suggérant que la combinaison d'un pacemaker bio-artificiel et d'un stimulateur électronique est envisageable (Bucchi et coll., 2006). Ceci pourrait permettre des battements cardiaques plus efficaces et sécurisés, et surtout d'économiser la batterie et donc d'allonger le délai entre deux interventions chirurgicales.

## BIBLIOGRAPHIE

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 97(2):175-187, 1999.

Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol. Sci.* 17:32–37, 2002.

Accili EA, Robinson RB, DiFrancesco D. Properties and modulation of If in newborn versus adult cardiac SA node. *Am. J. Physiol.* 272(3 Pt 2):H1549-H1552, 1997.

Adamo RF, Guay CL, Edwards AV, Wessels A, Burch JB. GATA-6 gene enhancer contains nested regulatory modules for primary myocardium and the embedded nascent atrioventricular conduction system. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 280(2):1062-1071, 2004.

Alings AM, Abbas RF, Bouman LN. Age-related changes in structure and relative collagen content of the human and feline sinoatrial node. A comparative study. *Eur. Heart J.* 16(11):1655–1667, 1995.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 549(Pt 2):347-359, 2003.

Arinsburg SS, Cohen IS, Yu HG. Constitutively active Src tyrosine kinase changes gating of HCN4 channels through direct binding to the channel proteins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47(4):578-586, 2006.

Azene EM, Xue T, Marban E, Tomaselli GF, Li RA. Non-equilibrium behavior of HCN channels: insights into the role of HCN channels in native and engineered pacemakers. *Cardiovasc. Res.* 67(2):263-273, 2005.

Barbuti A, Galvez BG, Crespi A, Scavone A, Baruscotti M, Brioschi C, Cossu G, DiFrancesco D. Mesoangioblasts from ventricular vessels can differentiate in vitro into cardiac myocytes with sinoatrial-like properties. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(2):415-23, 2010.

Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42(1):71–78, 2007.

Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol. Ther.* 107(1):59–79, 2005.

- Baruscotti M, DiFrancesco D, Robinson RB. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 492(Pt 1):21–30, 1996.
- Baruscotti M, Westenbroek R, Catterall WA, DiFrancesco D, Robinson RB. The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na<sup>+</sup> channel. *J. Physiol.* 498(Pt 3):641–648, 1997.
- Benson DW. Genetics of atrioventricular conduction disease in humans. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280(2):934-939, 2004.
- Bescond J, Bois P, Petit-Jacques J, Lenfant J. Characterization of an angiotensin-II-activated chloride current in rabbit sino-atrial cells. *J. Membr. Biol.* 140(2):153–161, 1994.
- Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott DA, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ Res.* 87: 888–895, 2000.
- Bignolais O, Quang KL, Naud P, El Harchi A, Briec F, Piron J, Bourge A, Leoni AL, Charpentier F, Demolombe S. Early ion-channel remodeling and arrhythmias precede hypertrophy in a mouse model of complete atrioventricular block. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2011. [Epub ahead of print].
- Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, Maxelon T, Anastassiadis K, Spitzer J, Hardt SE, Scholer H, Feitsma H, Rottbauer W, Blum M, Meijlink F, Rappold G, Gittenberger-de Groot AC. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaker development. *Circulation* 115(14):1830–1838, 2007.
- Bogdanov KY, Maltsev VA, Vinogradova TM, Lyashkov AE, Spurgeon HA, Stern MD, Lakatta EG. Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca<sup>2+</sup> releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Circ. Res.* 99(9):979–987, 2006.
- Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ. Res.* 88(12):1254-1258, 2001.
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett.* 481(1):73-76, 2000.
- Bois P, Renaudon B, Baruscotti M, Lenfant J, DiFrancesco D. Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 501 (Pt 3):565-71, 1997.



Boogerd KJ, Wong LY, Christoffels VM, Klarenbeek M, Ruijter JM, Moorman AF, Barnett P. Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin 43. *Cardiovasc. Res.* 78(3):485-493, 2008.

Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 47(4):658-687, 2000.

Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, Kodama I. Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 275(4 Pt 2):H1158–H1168, 1998.

Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J, Greener ID, Honjo H, Billeter R, Lei M, Zhang H, Efimov IR, Dobrzynski H. Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv. Cardiol.* 42:175–197, 2006.

Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, Kodama I. Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H686–H698, 1999

Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D, Baruscotti M. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47(2):221-7, 2009.

Brown H, DiFrancesco D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 308:331–351, 1980.

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature.* 280(5719):235-236, 1979.

Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation.* 109(1):30-5, 2004.

Brugada P, Wellens HJ. Early afterdepolarizations: role in conduction block, “prolonged repolarization-dependent reexcitation,” and tachyarrhythmias in the human heart. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 8(6):889–896, 1985.

Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43(1):39-48 2007.

Bucchi A, Plotnikov AN, Shlapakova I, Danilo P, Jr., Kryukova Y, Qu J et al. Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. *Circulation*. 114(10):992-999, 2006.

Bukauskas FF, Kreuzberg MM, Rackauskas M, Bukauskiene A, Bennett MV, Verselis VK, Willecke K. Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31 9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(25): 9726–9731, 2006.

Cai J, Yi FF, Li YH, Yang XC, Song J, Jiang XJ et al. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with complete atrioventricular block. *Life Sci*. 80(19):1746-1753, 2007.

Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ. Res*. 94(6):828–835, 2004.

Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 113(7):1005-1014, 2006.

Chan YC, Siu CW, Lau YM, Lau CP, Li RA, Tse HF. Synergistic effects of inward rectifier (I) and pacemaker (I) currents on the induction of bioengineered cardiac automaticity. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 20(9):1048-54, 2009.

Chen X, Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C 3rd, Bayliss DA. HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J. Neurosci*. 25(24):5803-14, 2005.

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

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* : 117(5):491-504, 2001.

Cho HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 550:169–180, 2003.

Christoffels VM, Smitis GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ. Res*. 106:240–254, 2010.

Clapham DE. Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* : 21(1):5-7, 1998.

Davies MJ. Pathology of chronic A-V Block. *Acta Cardiol: Suppl* 21:19-30, 1976.

Davies J, Spry CJ, Sapsford R, Olsen EG, de Perez G, Oakley CM et al. Cardiovascular features of 11 patients with eosinophilic endomyocardial disease. *Q. J. Med.* 52(205):23-39, 1983.

Davis DL, Edwards AV, Juraszek AL, Phelps A, Wessels A, Burch JB. A GATA-6 gene heart-region-specific enhancer provides a novel means to mark and probe a discrete component of the mouse cardiac conduction system. *Mech. Dev.* 108(1-2):105-119, 2001.

Délèze J., Delage, B., Hentati-Ksibi, O., Verrecchia, F., & Hervé, J.C. Fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol. Biol.* 154:313-327, 2001.

De Maziere AM, van Ginneken AC, Wilders R, Jongsma HJ, Bouman LN. Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24(6):567-578, 1992.

DiFrancesco D. A New interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibers. *J. Physiol.* 314: 359-376, 1981.

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

DiFrancesco D, Mangoni M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (If) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1994; 474 : 473-82.

DiFrancesco D. Serious workings of the funny current. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 90(1-3):13-25, 2006.

DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* 106(3):434-46, 2010.

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

DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 377:61-88, 1986.

Dobrzynski H, Li J, Tellez J, Greener ID, Nikolski VP, Wright SE, Parson SH, Jones SA, Lancaster MK, Yamamoto M, Honjo H, Takagishi Y, Kodama I, Efimov IR, Billeter R, Boyett MR. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation.* 111(7):846-854, 2005.

Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J. Clin. Invest.* 101(2):337-343, 1998.

Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart.* 86(5):559-562, 2001.

Elinder F, Mannikko R, Pandey S, Larsson HP. Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels. *J. Physiol.* 575(Pt 2):417-431, 2006.

Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ et al. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current  $I_f$  and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation.* 107(3):485-489, 2003.

Espinoza-Lewis, R.A., Yu, L., He, F., Liu, H., Tang, R., Shi, J., Sun, X., Martin, J.F., Wang, D., Yang, J., Chen, Y.P., 2009. *Shox2* is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing *Nkx2-5*. *Dev. Biol.* 327(2):376–338, 2009.

Espinoza-Lewis RA., Liu H., Sun C., Chen C., Jiao K., Chen Y. Ectopic expression of *Nkx2.5* suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Dev. Biol.* 356(2):359–369, 2011.

Fahrenbach JP, Ai X, Banach K. Decreased intercellular coupling improves the function of cardiac pacemakers derived from mouse embryonic stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45(5):642-9, 2008.

Farès N, Bois P, Lenfant J, Potreau D. Characterization of a hyperpolarization-activated current in dedifferentiated adult rat ventricular cells in primary culture. *J Physiol.* 1;506 ( Pt 1):73-82, 1998.

Gao Z., Chen B., Joiner MA., Wu Y., Guan X., Koval OM., Chaudhary AK., Cunha SR., Mohler PJ., Martins JB., Song LS., Anderson ME.  $I_f$  and SR  $Ca^{2+}$  release both contribute to pacemaker activity in canine sinoatrial node cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49(1):33-40, 2010.

Giles W, Noble SJ. Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. *J Physiol* 261(1):103-23, 1976.

Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23(1):175-182, 1981.

Graf EM, Heubach JF, Ravens U. The hyperpolarization-activated current  $I_f$  in ventricular myocytes of non-transgenic and beta2-adrenoceptor overexpressing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364(2):131-139, 2001.

- Guo J, Noma A. Existence of a low-threshold and sustained inward current in rabbit atrio-ventricular node cells. *Jpn. J. Physiol.* 47(4):355–359, 1997.
- Guo J, Ono K, Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 483(Pt 1):1–13, 1995.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J. Physiol.* 395:233–253, 1988.
- Hagiwara N, Masude H, Shoda M, Irisawa H. Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* 456:285-302, 1992.
- Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. *J. Physiol.* 490(Pt 2):337–350, 1996.
- Harvey RP. NK-2 Homeobox Genes and Heart Development. *Dev. Biol.* 178(2):203-216, 1996.
- Hartzell HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 52(3):165-247, 1988.
- Hejtmancik MR, Herrmann GR, Shields AH, Wright JC. A clinical study of complete heart block. *Am. Heart. J.* 52(3):369-378, 1956.
- Herrmann S, Stieber J, Stockl G, Hofmann F, Ludwig A. HCN4 provides a “depolarization reserve” and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO. J.* 26(21):4423-4432, 2007.
- Hervé JC, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathol. Biol.* 56(5):334-341, 2008.
- Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E, Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J. Physiol.* 554(Pt 3):659-672, 2004.
- Honjo H, Lei M, Boyett MR, Kodama I. Heterogeneity of 4-aminopyridine-sensitive current in rabbit sinoatrial node cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 276(4 Pt 2):H1295–H1304, 1999.
- Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM. Tbox factors determine cardiac design. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(6):646–660, 2007.

Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravesloot JH, Moorman AF, Verheijck EE, Christoffels VM. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* 21(9):1098–1112, 2007.

Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc. Res.* 62(3):489-99, 2004.

Huang X, Yang P, Du Y, Zhang J, Ma A. Age-related down-regulation of HCN channels in rat sinoatrial node. *Basic. Res. Cardiol.* 102(5):429-435, 2007.

Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol.* 524 Pt 2:415-422, 2000.

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

Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274(18):12835-12839, 1999.

James TN. Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: part II–function. *Prog. CardiovascDis.* 45(4):327–360, 2003.

Janse MK, Anderson RH, van Capelle FJ, Durrer D. A combined electrophysiological and anatomical study of the human fetal heart. *Am. Heart J.* 91(5):556-562, 1976.

January CT, Moscucci A. Cellular mechanisms of early afterdepolarizations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 644:23–32, 1992.

Joyner RW, van Capelle FJ. Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophys J.* 50(6):1157–64, 1986.

Kashiwakura Y, Cho HC, Barth AS, Azene E, Marban E. Gene transfer of a synthetic pacemaker channel into the heart: a novel strategy for biological pacing. *Circulation.* 114(16):1682-1686, 2006.

Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22(10):1282-1289, 2004.

Kléber AG, Janse MJ, Fats VG. Normal and abnormal conduction in the heart. In: Handbook of physiology. Section 2, The Cardiovascular system. Volume 1, The heart. Oxford university press:455-570, 2001.

Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. Functional properties of mouse connexin 30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ. Res.* 96(11):1169–1177, 2005.

Kreuzberg MM, Willecke K, Bukauskas FF. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends. Cardiovasc. Med.* 16(8):266–272, 2006.

Kohl P, Kamkin AG, Kiseleva IS, Noble D. Mechanosensitive fibroblasts in the sino-atrial node region of rat heart: interaction with cardiomyocytes and possible role. *Exp. Physiol.* 79(6):943–956, 1994.

Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J et al. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *J. Biol. Chem.* 276(25):22100-22106, 2001.

Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Effects of pacemaker currents on creation and modulation of human ventricular pacemaker: theoretical study with application to biological pacemaker engineering. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292(1):H701-H718, 2007.

Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, Marek-Yagel D, Pras E, Dascal N, Antzelevitch C, Nof E, Reznik H, Eldar M, Luria D. A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in moroccan jews. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 21(12):1365-72, 2010.

Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca<sup>2+</sup> clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ. Res.* 106(4):659-73, 2010.

Lei M, Cooper PJ, Camelliti P, Kohl P. Role of the 293b-sensitive, slowly activating delayed rectifier potassium current, i(K<sub>s</sub>), in pacemaker activity of rabbit isolated sino-atrial node cells. *Cardiovasc. Res.* 53(1):68–79, 2002

Lei M, Goddard C, Liu J, Leoni AL, Royer A, Fung SS, Xiao G, Ma A, Zhang H, Charpentier F, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA, Huang CL. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J. Physiol.* 567(Pt 2):387–400, 2005.

Lei M, Honjo H, Kodama I, Boyett MR. Characterisation of the transient outward K<sup>+</sup> current in rabbit sinoatrial node cells. *Cardiovasc. Res.* 46(3):433–441, 2000.

- Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SK, Noble D, Boyett MR. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.* 559(Pt 3):835–848, 2004.
- Lenegre J, Moreau P. Chronic auriculo-ventricular block. Anatomical, clinical and histological study. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 56:867-888, 1963.
- Lentz BR, Lee JK. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol. Membr. Biol.* 16(4):279-296, 1999.
- Lev M. The normal anatomy of the conduction system in man and its pathology in atrioventricular block. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 111:817-829, 1964.
- Liao Z, Lockhead D, Larson ED, Proenza C. Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J. Gen. Physiol.* 136(3):247-58, 2010.
- Lin G, Cai J, Jiang H, Shen H, Jiang X, Yu Q, Song J. Biological pacemaker created by fetal cardiomyocyte transplantation. *J. Biomed.* 90(2):470-479, 2005.
- Lomax AE, Rose RA, Giles WR. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K<sup>+</sup> current in adult mouse atria. *Br. J. Pharmacol.* 140(3):576-574, 2003.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* 393(6685):587-591, 1998.
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO. J.* 18(9):2323-2329, 1999.
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K et al. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO. J.* 22(2):216-224, 2003.
- McCrossan ZA, Roepke TK, Lewis A, Panaghie G, Abbott GW. Regulation of the Kv2.1 potassium channel by MinK and MiRP1. *J. Membr. Biol.* 228(1):1-14, 2009.
- Macri V, Accili EA. Structural elements of instantaneous and slow gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 279(16):16832-16846, 2004.
- Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, Scheuer T. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(6):3507–3512, 2003.



- Maltsev VA, Vinogradova TM, Lakatta EG. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J. Pharmacol. Sci.* 100(5):338–369, 2006.
- Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization activated current [I<sub>f</sub>] in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 52(1):51–64, 2001.
- Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 88(3):919-982, 2008.
- Mangoni ME, Striessnig J, Platzer J, Nargeot J. Pacemaker currents in mouse pacemaker cells. *Circulation.* 104:R1047, 2001.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(9):5543-5548, 2003.
- Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ. Res.* 98(11):1422-1430, 2006.
- Mannikko R, Pandey S, Larsson HP, Elinder F. Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties. *J. Gen. Physiol.* 125(3):305-326, 2005.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.* 562(Pt 1):223-234, 2005.
- Matsuura H, Ehara T, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K(+) current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *J. Physiol.* 540(Pt 3):815-830, 2002.
- Meijler FL, Janse MJ. Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node. *Physiol. Rev.* 68(2):608-647, 1988.
- Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature.* 419(6903):132-133, 2002.
- Miake J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J. Clin. Invest.* 111(10):1529-1536, 2003.

Michels G, Er F, Khan IF, Endres-Becker J, Brandt MC, Gassanov N, Johns DC, Hoppe UC. K<sup>+</sup> channel regulator KCR1 suppresses heart rhythm by modulating the pacemaker current I<sub>f</sub>. *PLoS One*. 3(1):e1511, 2008.

Michels G, Er F, Khan I, Sudkamp M, Herzig S, Hoppe UC. Single-channel properties support a potential contribution of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and I<sub>f</sub> to cardiac arrhythmias. *Circulation*. 111(4):399-404, 2005.

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

Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P et al. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc. Res.* 63(1):77-86, 2004.

Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ. Res.* 87(2):88-91, 2000.

Moe GK, Preston JB, Burlington H. Physiologic evidence for a dual A-V transmission system. *Circ. Res.* 4(4):357-375, 1956.

Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ. Res.* 100(3):354-362, 2007.

Monir G, Dreifus LS, Guroy AS, Kutalek SP. Escape capture bigeminy: a manifestation of sinoatrial conduction block. *J. Electrocardiol.* 32(1):51-55, 1999.

Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, evolution. *Physiol. Rev.* 83(4):1223-1267, 2003.

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

Nakayama T, Kurachi Y, Noma A, Irisawa H. Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. *Pflugers Arch.* 402(3):248–257, 1984.

Nikolski V, Efimov I. Fluorescent imaging of a dual-pathway atrioventricular-nodal conduction system. *Circ Res* 88: E23–30, 2001.

- Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M et al. Cav3.2 subunit underlies the functional T-type Ca<sup>2+</sup> channel in murine hearts during the embryonic period. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(6):H2257-H2263, 2004.
- Niu P, Huang CX, Zhao YQ, Yang B, Zhao QY, Wang T, Fan GH.. [Recombinant plasmid pIRES2-EGFP-HCN2 improved pacing function in canine model of sick sinus syndrome]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 34(12):1126-1130, 2006.
- Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J. Physiol.* 353:1-50, 1984.
- Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation.* 116(5):463–470, 2007.
- Noma A, Nakayama T, Kurachi Y, Irisawa H. Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. *Jpn. J. Physiol.* 34(2):245–254, 1984.
- Noma A, Trautwein W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers. Arch.* 377(3): 193–200, 1978.
- Ono K, Shibata S, Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J Physiol* 524 (Pt 1):51–62, 2000.
- Opthof T, de Jonge B, Jongsma HJ, Bouman LN. Functional morphology of the mammalian sinoatrial node. *Eur. Hear.t J.* 8(11):1249–1259, 1987.
- Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AE, Huang CL, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(9):6210–6215, 2002.
- Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58:299-327, 1996.
- Pennisi DJ, Rentschler S, Gourdie RG, Fishman GI, Mikawa T. Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int. J. Dev. Biol.* 46(6):765–775, 2002.
- Peters, R. Nuclear envelope permeability measured by fluorescence microphotolysis of single liver cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 258(19):11427-11429, 1983.

Petit-Jacques J, Bois P, Bescond J, Lenfant J. Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. *Pflugers. Arch.* 423(1-2):21–27, 1993.

Pian P, Bucchi A, Robinson RB, Siegelbaum SA. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP<sub>2</sub>. *J. Gen. Physiol.* 128(5):593-604, 2006.

Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R., & Ruskoaho, H. GATA transcription Factors in the developing and adult heart. *Cardiovascular. Research.* 63(2)196-207, 2004.

Piron J, Quang KL, Briec F, Amirault JC, Leoni AL, Desigaux L, Escande D, Pitard B, Charpentier F. Biological pacemaker engineered by nonviral gene transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. *Mol. Ther.* 16(12):1937-43, 2008.

Pitard B, Bello-Roufaï M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, Escande D. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic. Acids. Res.* 32(20):e159, 2004.

Plotnikov AN, Bucchi A, Shlapakova I, Danilo P Jr, Brink PR, Robinson RB, Cohen IS, Rosen MR. HCN212-channel biological pacemakers manifesting ventricular tachyarrhythmias are responsive to treatment with I(f) blockade. *Heart Rhythm.* 5(2):282-8, 2008.

Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabolcs MJ, Danilo P, Jr., Lorell BH, Potapova IA et al. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. *Circulation.* 116(7):706-713, 2007.

Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation.* 109(4):506-512, 2004.

Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ. Res.* 94(7):952-959, 2004.

Protas L, DiFrancesco D, Robinson RB. L-type but not T-type calcium current changes during postnatal development in rabbit sinoatrial node. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281(3):H1252-H1259, 2001.

Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ Res* 2001; 89(1):E8-14.

Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G et al. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 279(42):43497-43502, 2004.

Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation.* 107(8):1106-1109, 2003.

Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B. Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* 16(11):1318-1324, 2005.

Roepke TK, Kontogeorgis A, Ovanez C, Xu X, Young JB, Purtell K, Goldstein PA, Christini DJ, Peters NS, Akar FG, Gutstein DE, Lerner DJ, Abbott GW. Targeted deletion of *kcnj2* impairs ventricular repolarization via disruption of I(K,slow1) and I(to,f). *FASEB. J.* 22(10):3648-60, 2008.

Rosen MR, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB. Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc. Res.* 64(1):12-23, 2004.

Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ. Res.* 92(11):1217-1224, 2003.

Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Niehaus M, Mengel M, Irtel T, Kofidis T et al. Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 21(5):853-857, 2002.

Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(26):14815-14820, 1997.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell.* 93(5):717-729, 1998.

Sato H, Tsuchida K. Comparison of a calcium antagonist, CD-349, with nifedipine, diltiazem, and verapamil in rabbit spontaneously beating sinoatrial node cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21(5):685-692, 1993.

Sato H. Role of T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors in the pacemaker depolarization in rabbit sino-atrial nodal cells. *Gen. Pharmacol.* 26(3):581-587, 1995.

Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.* 111(10):1537-1545, 2003.

Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(16):9391-9396, 1999.

Sekar RB, Kizana E, Cho HC, Molitoris JM, Hesketh GG, Eaton BP, Marbán E, Tung L. IK1 heterogeneity affects genesis and stability of spiral waves in cardiac myocyte monolayers. *Circ. Res.* 104(3):355-64, 2009.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* 85(1):e1-e6, 1999.

Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K<sup>+</sup> current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J. Physiol.* 523(Pt 3):593-605, 2000.

Soufan AT, Ruijter JM, van den Hoff MJ, de Boer PA, Hagoort J, Moorman AF. Three-dimensional reconstruction of gene expression patterns during cardiac development. *Physiol. Genomics.* 13(3):187-195, 2003.

Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(25):15235-15240, 2003.

Tong M, Yang XJ, Geng BY, Han LH, Zhou YF, Zhao X, Li HX. Overexpression of connexin 45 in rat mesenchymal stem cells improves the function as cardiac biological pacemakers. *Chin. Med. J.* 123(12):1571-1576, 2010.

Tsang SY, Lesso H, Li RA. Dissecting the structural and functional roles of the S3-S4 linker of pacemaker (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated) channels by systematic length alterations. *J. Biol. Chem.* 279(42):43752-43759, 2004.

Tse HF, Xue T, Lau CP, Siu CW, Wang K, Zhang QY et al. Bioartificial sinus node constructed via in vivo gene transfer of an engineered pacemaker HCN Channel reduces the dependence on electronic pacemaker in a sick-sinus syndrome model. *Circulation.* 114(10):1000-1011, 2006.

Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J. Biol. Chem.* 279(26):27194-27198, 2004.

Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M et al. The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1446(3):419-425, 1999.

Verheijck EE, Wilders R, Joyner RW, Golod DA, Kumar R, Jongsma HJ et al. Pacemaker synchronization of electrically coupled rabbit sinoatrial node cells. *J. Gen. Physiol.* 111(1):95-112, 1998.

Verheijck EE, Wessels A, van Ginneken AC, Bourier J, Markman MW, Vermeulen JL, de Bakker JM, Lamers WH, Opthof T, Bouman LN. Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. *Circulation* 97(16): 1623–1631, 1998.

Verkerk AO, Wilders R, Zegers JG, van Borren MM, Ravestloot JH, Verheijck EE.  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  current in rabbit sinoatrial node cells. *J. Physiol.* 540(Pt 1):105–117, 2002.

Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. Novel perspectives on the beating rate of the heart. *Circ. Res.* 91(4):e3, 2002.

Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ. Res.* 90(1):73-79, 2002.

Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, Deo S, Barlow M, Johnson S, Caffrey JL, Zhou YY, Xiao RP, Cheng H, Stern MD, Maltsev VA, Lakatta EG. High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal  $Ca^{2+}$  store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ. Res.* 98(4):505–514, 2006.

Vinogradova TM, Maltsev VA, Bogdanov KY, Lyashkov AE, Lakatta EG. Rhythmic  $Ca^{2+}$  oscillations drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047:138-156, 2005.

Vinogradova TM, Zhou YY, Bogdanov KY, Yang D, Kuschel M, Cheng H, Xiao R-P. Sinoatrial node pacemaker activity requires  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ. Res.* 87(9):760–767, 2000.

Vinogradova TM, Zhou YY, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG. Rhythmic ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ. Res.* 94(6):802-809, 2004.

Viswanathan PC, Coles JA, Jr., Sharma V, Sigg DC. Recreating an artificial biological pacemaker: insights from a theoretical model. *Heart Rhythm.* 3(7):824-831, 2006.

- Wade, M.H., Trosko, J.E., & Schindler, M. A fluorescence photobleaching assay of gap junction mediated communication between human cells. *Science*. 232:(4749):525-528, 1986.
- Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto R, Accili EA. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* 282(31):22900-22909, 2007.
- Wickman K, Clapham DE. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* 75(4):865-885, 1995.
- Wickman K, Krapivinsky G, Corey S, Kennedy M, Nemec J, Medina I, Clapham DE. Structure, G protein activation, functional relevance of the cardiac G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IK<sub>ACh</sub>. *Ann. NY. Acad. Sci.* 868:386–398, 1999.
- Wiese C, Grieskamp T, Airik R, Mommersteeg MT, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, Schuster-Gossler K, Moorman AF, Kispert A, Christoffels VM. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ. Res.* 104(3):388-97, 2009.
- Xue T, Cho HC, Akar FG, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation*. 111(1):11-20, 2005.
- Yang ZF, Sun Y, Li CZ, Wang HW, Wang XJ, Zheng YQ et al. Reduced sinoatrial cAMP content plays a role in postnatal heart rate slowing in the rabbit. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33(8):757-762, 2006.
- Yang XJ, Zhou YF, Li HX, Han LH, Jiang WP. Mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create biological pacemaker cells in vitro. *J. Int. Res.* 36(5):1049-55, 2008.
- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J et al. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* 88(12):E84-E87, 2001.
- Yu X, Chen XW, Zhou P, Yao L, Liu T, Zhang B, Li Y, Zheng H, Zheng LH, Zhang CX, Bruce I, Ge JB, Wang SQ, Hu ZA, Yu HG, Zhou Z. Calcium influx through If channels in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292(3):C1147–C1155, 2007.
- Yuill KH, Hancox JC. Characteristics of single cells isolated from the atrioventricular node of the adult guinea-pig heart. *Pflügers. Arch.* 445(3):311-20, 2002.
- Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Sustained inward current and pacemaker activity of mammalian sinoatrial node. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13(8):809-812, 2002.



Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Gradient model versus mosaic model of the sinoatrial node. *Circulation* 103(4):584–8, 2001.

Zhang H, Holden AV, Kodama I, Honjo H, Lei M, Varghese T, Boyett MR. Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279(1):H397–H421, 2000.

Zhou BY, Ye Z, Chen G, Gao ZP, Zhang YA, Cheng L. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. *Stem Cells.* 25(3):779-789, 2007.

Zolles G, Klocker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron.* 52(6):1027-1036, 2006.

Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H, Fang L et al. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol. Chem.* 280(40):34224-34232, 2005.

## Résumé

---

### Création de pacemakers bio-artificiels cardiaques

L'objectif de cette thèse était de développer un pacemaker cardiaque bio-artificiel par transfert de gènes. Deux approches différentes ont été utilisées.

Dans la première, nous avons développé un pacemaker bio-artificiel chez des souris en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). La transfection des cardiomyocytes a été réalisée *in situ* avec un vecteur non-viral de type poloxamine, le Tetronic 614. Sept jours avant l'obtention du BAVc par ablation du faisceau de His, 2 plasmides, codant respectivement une protéine de fusion HCN1-HCN2 générant un courant de pacemaker,  $I_f$ , et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, ont été mélangés au vecteur et injectés en un seul point dans la paroi du ventricule gauche. Le rythme d'échappement ventriculaire des souris HCN1-HCN2 / ADRB2 était significativement plus rapide que celui des souris témoins (injectées avec un plasmide non codant) dès 5 jours après l'induction du BAVc et restait stable pendant la durée de l'étude (25 jours). Ce pacemaker bio-artificiel est régulé par la stimulation sympathique.

Dans la seconde approche, nous avons tenté de développer une stratégie basée sur la surexpression du facteur de transcription T-box 3 (Tbx3). Tbx3 régule le programme d'expression des gènes du nœud sinusal ainsi que le phénotype sinusal durant le développement. Cette étude a été réalisée *in vitro* avec des cardiomyocytes ventriculaires de souris nouveau-nées en culture. La surexpression de Tbx3 dans les cardiomyocytes à l'aide d'un adénovirus induit une reprogrammation du phénotype contractile de ces cellules vers un phénotype proche de celui des cellules sinusales. Ce résultat suggère qu'il serait possible d'utiliser cette approche *in vivo*.

Mots-clés : thérapie génique, canal HCN, récepteur adrénergique, bloc de conduction cardiaque, Tbx3, reprogrammation cellulaire, phénotype pacemaker.

**Abstract**

---

**Engineering of cardiac bio-artificial pacemakers**

The goal of this study was to develop a bio-artificial cardiac pacemaker by gene transfer. Two approaches have been used.

In the first approach, we generated a bio-artificial pacemaker in a mouse model of complete atrioventricular block (CAVB). The transfection of cardiomyocytes was performed *in situ* with a non viral vector, the Tetronic 614, a poloxamine. Seven days before CAVB induction, two plasmids coding respectively an HCN1-HCN2 fusion protein, which generates a pacemaker current,  $I_f$ , and the  $\beta_2$ -adrenergic receptor, were mixed with the vector and injected in a single site of the left ventricular free wall. The escape ventricular rhythm in HCN1-HCN2 / Adrb2 mice was significantly faster than in control mice (injected with a non-coding plasmid) at five days after CAVB induction and remained stable over 25-days study period. This bio-artificial pacemaker was regulated by sympathetic input.

In the second approach, we attempted to develop a new strategy based on the overexpression of T-box transcription factor 3 (Tbx3). Tbx3 regulates sino-atrial node (SAN) pacemaker gene expression program and phenotype during cardiac development. This study was realised *in vitro* with cultured neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. Overexpression of Tbx3 using an adenoviral vector in cardiomyocytes reprogrammed the contractile phenotype of the myocytes into a phenotype close to the phenotype of SAN pacemaker cells. This result suggests that it may be possible to use this approach *in vivo*.

Keywords: gene therapy, HCN channel, adrenergic receptor, heart block, Tbx3, cellular reprogramming, pacemaker phenotype.