

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE - BIOLOGIE

Année 2006

Modèles murins en rythmologie expérimentale

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Physiologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Anne-Laure LEONI

Le 23 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	Mr. LE MAREC Hervé, <i>Professeur, Université de Nantes, Inserm U533</i>
<i>Rapporteurs</i>	Mr. BABUTY Dominique, <i>Professeur, Université de Tours</i> Mr. WEISSENBURGER Jacques, <i>Docteur, Faculté de médecine Saint Antoine, Université Paris VI</i>
<i>Examineurs</i>	Mr. ABRIEL Hugues, <i>Professeur, Université de Lausanne</i> Mr. MANGONI Matteo, <i>Chargé de recherche, CNRS UMR5203-INSERM U661, Montpellier</i>
<i>Membre invité</i>	Mr. GUILLON Jean-Michel, <i>Docteur, Sanofi-Aventis, Rueil-Malmaison</i>
<i>Directeur de thèse</i>	Mr. ESCANDE Denis, <i>Professeur, Université de Nantes, Inserm U533</i>

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	6
I. Automatismes et conduction de l'influx électrique cardiaque	8
A. Automatismes cardiaques primaires	8
1. Déterminisme cellulaire de l'activité <i>pacemaker</i> primaire	8
2. Canaux ioniques participant à la dépolarisation diastolique	10
a. Canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques (HCN).....	11
b. Canaux calciques dépendant du potentiel	12
c. Canaux sodiques dépendant du potentiel	14
d. Canaux générant le courant sodique entrant soutenu	15
e. Canaux potassiques dépendant du potentiel.....	16
f. Canaux potassiques indépendant du potentiel.....	17
3. Mécanisme physiologique de la dépolarisation diastolique.....	18
B. Conduction de l'influx électrique dans le cœur	26
1. Du nœud sinusal vers les oreillettes	26
2. Du nœud sinusal vers le nœud auriculo-ventriculaire.....	29
a. Propriétés des cellules du nœud auriculo-ventriculaire.....	29
b. Spécificité des courants ioniques du nœud auriculo-ventriculaire.....	33
3. Du nœud auriculo-ventriculaire au myocarde ventriculaire.....	34
II. Modèles murins de dysfonction sinusale et/ou de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire	39
A. Rappels de physiologie cardiaque chez la souris	39
B. Dysfonction sinusale et modèles murins.....	44
1. Dysfonction sinusale ou "sick sinus syndrome".....	45
2. Modèles murins de dysfonction sinusale	46
a. Dysfonction sinusale liée au vieillissement	46
b. Dysfonction sinusale associée à une cardiopathie.....	47
c. Dysfonction sinusale idiopathique	48
♦ Avec perte de fonction des canaux HCN	48
♦ Avec perte de fonction du canal sodique SCN5A.....	51
♦ Avec perte de fonction des canaux calciques.....	52
♦ Avec perte de fonction du canal ERG.....	56
♦ Avec perte de fonction de la protéine d'ancrage Ankyrine B	56
♦ Avec gain de fonction du canal Kir2.1	57
d. Dysfonction sinusale associée à un désordre hormonal ou métabolique	57
C. Modèles murins et troubles de conduction auriculo-ventriculaire	58
1. Classification clinique des troubles de la conduction AV.....	58
2. Modèles murins de troubles de la conduction AV	62
a. Troubles de conduction associés à des anomalies cardiaques structurales	62
♦ Anomalies de septation cardiaque.....	63
♦ Anomalies des protéines du cytosquelette	66
♦ Anomalies du métabolisme cellulaire	70
i. Métabolisme glucidique	70
ii. Métabolisme lipidique.....	71
iii. Homéostasie calcique.....	72
b. Troubles de conduction survenant sur un cœur apparemment sain	72

♦ Avec perte de fonction du canal sodique <i>SCN5A</i>	73
♦ Avec perte de fonction des canaux calciques.....	77
♦ Avec perte de fonction des connexines.....	77
III. Modulation pharmacologique de l'automatisme et de la conduction cardiaque ...	79
A. Inhibiteurs des canaux HCN	79
B. Inhibiteurs des canaux sodiques.....	80
C. Inhibiteurs des canaux potassiques	82
D. Inhibiteurs des canaux calciques	85
E. β -bloquants.....	85
F. Digitaliques	86
MATÉRIELS ET MÉTHODES	89
I. Electrocardiogramme de surface.....	89
A. Chez la souris anesthésiée	89
B. Chez la souris vigile	91
II. Electrocardiogramme endocavitaire chez la souris.....	92
III. Enregistrement des courants ioniques par la technique de patch-clamp	95
A. Sur cardiomyocytes isolés du nœud sinusal et du nœud AV	95
1. Prélèvement du nœud sinusal et du nœud AV chez la souris.....	95
2. Dissociation des cardiomyocytes issus des nœuds.....	96
3. Enregistrement des courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$	96
B. Sur cardiomyocytes ventriculaires	97
1. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires.....	97
2. Enregistrement du courant I_{Na}	98
IV. RT-PCR quantitative.....	98
A. Quantification individuelle.....	100
B. Quantification à haut débit	101
C. Classification hiérarchique des données d'expression	102
V. Statistiques	102
RÉSULTATS	103
I. Bradycardie et ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire chez les souris invalidées pour la sous-unité Ca_v 3.1 des canaux calciques de type T.	103
A. Introduction	103
B. Résultats	105
C. Discussion - Conclusion.....	106
II. Souris <i>Scn5a</i>^{+/-}, un modèle d'étude des troubles du rythme cardiaque associés à une perte de fonction du gène <i>SCN5A</i>.....	108
A. Dysfonction sinusale consécutive à l'invalidation du gène codant pour le canal sodique cardiaque, <i>Scn5a</i> , chez la souris.....	108
1. Introduction	108
2. Résultats	111
3. Discussion - Conclusion.....	113

B. Hétérogénéité phénotypique associée à une perte de fonction du gène SCN5A.....	114
1. Introduction	114
2. Résultats	117
3. Discussion - Conclusion.....	121
III. Modification de l'expression transcriptionnelle des canaux ioniques dans le nœud sinusal chez la souris lors d'un ralentissement chronique de la fréquence cardiaque avec l'ivabradine.	124
A. Introduction	124
B. Résultats	127
C. Discussion - Conclusion.....	129
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

Index des illustrations

FIGURES

Figure 1	Système de commande de l'activité électrique cardiaque	2
Figure 2	Potentiel d'action enregistré dans les cellules du nœud sinusal chez la souris adulte	5
Figure 3	Carte de propagation de l'excitation dans le nœud sinusal chez le lapin	6
Figure 4	Dépendance au potentiel de l'activation d' $I_{Ca,T}$ et d' $I_{Ca,L}$	9
Figure 5	Séquence d'activation des principaux courants ioniques participant au potentiel d'action sinusal chez la souris adulte	15
Figure 6	Organisation cellulaire des canaux ioniques dans une cellule <i>pacemaker</i> idéale	16
Figure 7	Modulation du potentiel d'action sinusal par le système nerveux autonome	19
Figure 8	Représentation schématique d'une jonction communicante et de ses constituants	23
Figure 9	Localisation anatomique du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire chez la souris	24
Figure 10	Représentation schématique du cœur et des potentiels d'action correspondants aux différentes régions	26
Figure 11	Coupe histologique de la région du nœud auriculo-ventriculaire	27
Figure 12	Activation du nœud auriculo-ventriculaire	28
Figure 13	Division de la branche gauche du faisceau de His	31
Figure 14	Asymétrie du système His-Purkinje chez la souris	32
Figure 15	Potentels d'action enregistrés dans les cellules des fibres de Purkinje et de la paroi libre du ventricule chez la souris adulte	33
Figure 16	Comparaison des potentiels d'action ventriculaires et auriculaires humains (H) et murins (M), et électrocardiogrammes correspondants	38
Figure 17	Représentation schématique des courants ioniques et des potentiels	40

	d'action ventriculaires résultant de leur activation	
Figure 18	Dysfonction sinusale chez les souris HCN2 ^{-/-}	46
Figure 19	Dysfonction sinusale et troubles du rythme auriculaire chez les souris Ca _v 1.3 ^{-/-}	50
Figure 20	Electrocardiogrammes associés aux blocs auriculo-ventriculaires de différents degrés	55
Figure 21	Etiologies des troubles de conduction auriculo-ventriculaire	57
Figure 22	Tracés ECG de souris WT ou Tbx5 ^{+/-}	61
Figure 23	Cytosquelette du myocyte	62
Figure 24	Modèle murin de la maladie d'Emery-Dreifuss surexprimant la mutation H222P du gène LMNA	63
Figure 25	Ralentissement de l'activation du myocarde ventriculaire chez les souris invalidées pour le gène de la desmine (D7-des)	64
Figure 26	Evolution des paramètres ECG avec l'âge chez les patients atteints de troubles de conduction progressifs mutés SCN5A et chez les souris Scn5a ^{+/-}	72
Figure 27	Blocage des canaux HCN par l'ivabradine	76
Figure 28	Electrocardiogramme murin en D1	86
Figure 29	Schéma du système de conduction cardiaque et intervalles de l'ECG de surface et endocavitaire	89
Figure 30	Sonde octapolaire 2F et introduction dans la veine jugulaire droite	90
Figure 31	Dissection du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire chez la souris	91
Figure 32	Représentation schématique de la méthode du 2 ^{-ΔΔCt}	96
Figure 33	Photographie d'une carte microfluide ou <i>Low Density Array</i>	97
Figure 34	Variations de fréquence cardiaque sur 24h chez une souris sauvage (WT) et une souris Scn5a ^{+/-}	108
Figure 35	Six dérivations de l'ECG chez des souriceaux âgés de 3 jours	113
Figure 36	Effet d'une administration d'ajmaline ou de lidocaïne sur la durée du complexe QRS chez des souris WT ou Scn5a ^{+/-} âgées de 10 semaines	114

ou de plus de 53 semaines

Figure 37	Concentrations plasmatiques d'ivabradine et de S 18982 chez la souris après administration orale d'ivabradine à la dose de 5 mg/kg	123
Figure 38	Tachycardie ventriculaire et épisode de Torsade de pointe chez la souris vigile.	128

A. Tableaux

Tableau 1	Effets des antiarythmiques de classe I de la classification de Vaughan-Williams	77
Tableau 2	Effets des antiarythmiques des 4 classes de la classification de Vaughan-Williams	82

Abréviations

4-AP	4-aminopyridine
AC	Adénylate cyclase
Ach	Acétylcholine
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
BCC	Bloc de conduction congénital
Cx	Connexine
CIA	Communication interatriale
CIV	Communication interventriculaire
CT	Crista terminalis
DD	Dépolarisation diastolique
DHPs	Dihydropyridines
EAD	Early after depolarization
ECG	Electrocardiogramme
ERG	<i>Ether à gogo</i> related gene
FP	Fibres de Purkinje
HCN	Hyperpolarization cyclic nucleotides activated channels
HRV	Heart rate variability
IP	Injection intrapéritonéale
MDX	Dystrophie musculaire liée au chromosome X
NCX	Echangeur Na/Ca
Nœud AV	Nœud auriculo-ventriculaire
PA	Potentiel d'action
PDM	Potentiel diastolique maximal
PKA	Protéine kinase A
PREA	Période réfractaire effective de l'oreillette
PREAV	Période réfractaire effective du nœud AV
PREV	Période réfractaire effective du ventricule
RS	Réticulum sarcoplasmique
SAN	Nœud sinusal (sino-atrial node, en anglais)
SNA	Système nerveux autonome
SSS	Sick sinus syndrome
TTX	Tetrodotoxine
VLCAD	Very long chain acylCoA deshydrogenase
WT	Wild type

AVANT-PROPOS

Chez les mammifères, l'activité contractile du cœur est sous la dépendance de la dépolarisation automatique de cellules spécialisées, appelées cellules *pacemaker*. L'influx électrique issu de ces cellules se propage aux myocardiocytes auriculaire et ventriculaire au travers du système de conduction permettant l'activation séquentielle du myocarde contractile. L'activité électrique périodique des cardiomyocytes (potentiel d'action) est la résultante de mouvements d'ions (ou courants ioniques) de part et d'autre de la membrane plasmique au travers de protéines aussi appelées canaux ioniques.

Toutes les anomalies structurales ou fonctionnelles des courants ioniques cardiaques peuvent influencer sur la genèse et/ou la propagation de l'influx électrique dans le cœur et être à l'origine de troubles du rythme potentiellement létaux. Dans ce contexte, les mécanismes cellulaires responsables de l'automatisme et de la conduction de l'influx électrique dans le cœur ont largement été étudiés. Toutefois certains éléments, comme par exemple la séquence des mécanismes ioniques permettant l'initiation de la dépolarisation spontanée des cellules *pacemaker*, restent sujet à débat.

Par ailleurs, la modulation pharmacologique ciblée de ces courants a fait l'objet de nombreuses recherches afin de permettre le traitement de pathologies rythmiques, comme par exemple la fibrillation auriculaire dont la prévalence ne cesse d'augmenter dans la population générale.

Le travail exposé dans cette thèse a consisté à préciser le rôle de deux sous-unités de canaux ioniques à expression cardiaque, dans l'automatisme des cellules du nœud sinusal et la conduction de l'influx électrique dans le cœur. Leur implication en physiopathologie cardiaque a été étudiée grâce à la caractérisation de modèles de souris invalidées pour ces sous-unités.

Enfin la modulation du rythme constituant un enjeu majeur en thérapeutique cardiaque, nous nous sommes intéressés aux effets d'une administration chronique d'un inhibiteur des canaux *pacemaker* sur l'expression des canaux ioniques dans le cœur chez la souris.

INTRODUCTION

La fonction cardiaque dépend de la contraction séquentielle des différentes régions du cœur. Cette activité contractile des cardiomyocytes est déclenchée par une activité électrique commandée par des cellules spécialisées regroupées en nœuds, faisceaux et fibres. Ces cellules non contractiles, aussi appelées cellules cardionectrices, sont responsables de l'initiation et de la conduction de l'excitation qui permettra la contraction des cavités cardiaques.

Le système de commande de l'activité électrique du cœur (Figure 1) comprend :

- le nœud sinusal de KEITH et FLACK, près de l'orifice de la veine cave supérieure ;
- le nœud d'ASCHOFF-TAWARA ou nœud auriculo-ventriculaire (nœud AV) entre les oreillettes et ventricules, à la naissance de la cloison interventriculaire ;
- le faisceau de HIS et ses deux branches qui font suite au centre nodal et sont situés dans le septum interventriculaire ;
- le réseau de PURKINJE qui représente la terminaison du faisceau de HIS, et se ramifie sous l'endocarde ventriculaire.

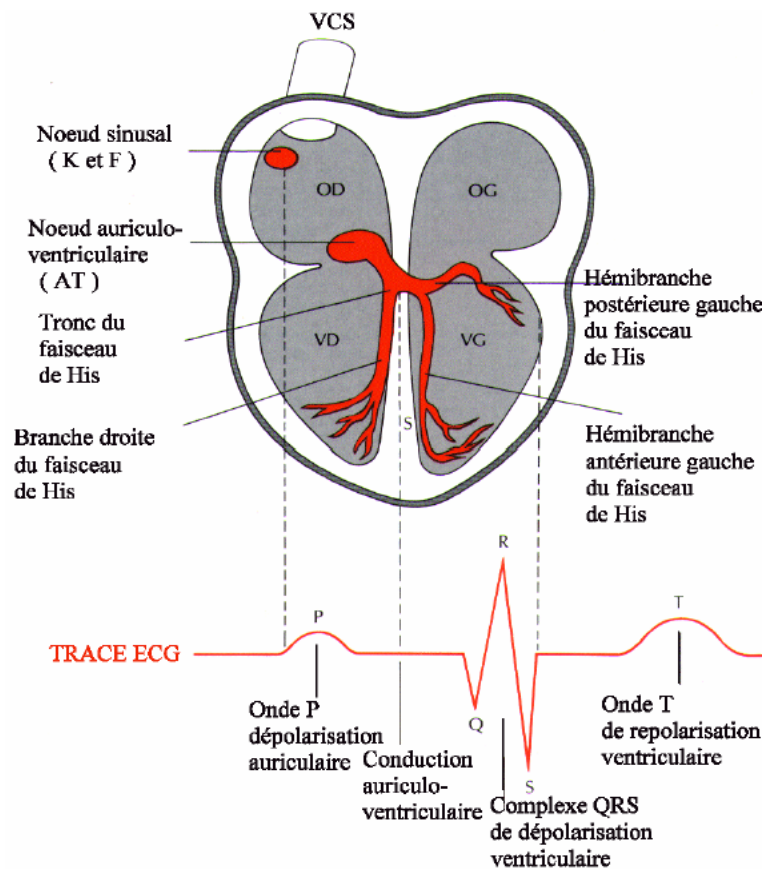


Figure 1 : **Système de commande de l'activité électrique cardiaque** et électrocardiogramme (ECG) associé. K et F, Keith et Flack ; AT, Aschoff-Tawara.

Les deux principales propriétés de ce système de commande sont l'automatisme et la conductibilité. En effet, les cellules de ce système se dépolarisent périodiquement, sans excitation extrinsèque ; mais chez un sujet normal, seul le centre sinusal (dont l'automatisme est plus rapide) impose son rythme à l'ensemble du système, c'est le *pacemaker* physiologique. Si le centre sinusal est défaillant, le centre nodal auriculo-ventriculaire prend la relève sur un rythme plus lent. La conductibilité quant à elle permet de transmettre l'onde de dépolarisation depuis le centre sinusal et nodal, jusqu'aux cellules myocardiques contractiles. Ainsi, chez le sujet normal, l'excitation issue du centre sinusal diffuse aux oreillettes et atteint le centre nodal ; l'influx parcourt ensuite le faisceau de HIS, ses branches, et le réseau de PURKINJE pour entraîner la contraction des ventricules.

L'activité électrique cardiaque globale ou électrocardiogramme (ECG) peut être enregistrée en surface grâce à des couples d'électrodes placées sur la peau. Le cheminement de l'onde d'excitation depuis son émission par le nœud sinusal jusqu'aux dernières portions du muscle ventriculaire explique la succession et la morphologie normale des ondes de l'ECG (Figure 1, page 2). L'onde P traduit l'excitation des oreillettes. L'intervalle isoélectrique entre la fin de l'onde P et le début du complexe QRS correspond pour 2/3 environ au cheminement lent de l'excitation dans le nœud d'Aschoff-Tawara, et pour 1/3 environ au cheminement plus rapide dans le faisceau de His et ses branches. L'intervalle PR allant du début de l'onde P au début du complexe QRS est l'addition des deux périodes précédentes. Le complexe QRS traduit l'excitation du myocarde ventriculaire. L'onde T correspond quant à elle à la repolarisation ventriculaire.

L'objet de la revue bibliographique qui va suivre sera de reprendre les mécanismes cellulaires présidant à l'automatisme et à la conduction de l'influx électrique dans le cœur de mammifère et plus particulièrement chez la souris. Puis nous nous intéresserons aux modèles murins d'intérêt en physiopathologie de la dysfonction sinusale et des troubles de la conduction du rythme cardiaque. Enfin nous aborderons la modulation pharmacologique de chacune des principales propriétés du système de commande du cœur.

I. AUTOMATISME ET CONDUCTION DE L'INFLUX ELECTRIQUE CARDIAQUE

B. Automatisme cardiaque primaire

1. Déterminisme cellulaire de l'activité *pacemaker* primaire

L'activité électrique cardiaque est initiée par une structure hautement spécialisée située dans la paroi de l'atrium droit, le nœud sinusal (sino-atrial node, SAN). Dans toutes les espèces, le nœud sinusal est localisé dans l'oreillette droite à la jonction entre la *crista terminalis*, les veines caves supérieure et inférieure et le septum interatrial (Boyett *et al.*, 2000).

Pendant la diastole qui correspond à la relaxation mécanique du cœur, les cardiomyocytes contractiles auriculaires et ventriculaires sont dépourvus d'activité électrique et sont normalement au repos à un potentiel membranaire hyperpolarisé. Au contraire, les myocytes du nœud sinusal ont un potentiel d'action (PA) caractérisé par la présence d'une pente de dépolarisation diastolique lente. A la fin d'un PA issu du nœud sinusal, le potentiel de la membrane ne se stabilise pas à un niveau négatif mais remonte progressivement jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement d'un nouveau PA.

Le nœud sinusal est une structure hétérogène formée de différents types cellulaires. Des fibroblastes et du collagène entourent des cellules d'origine musculaire. Les cellules situées à la périphérie du nœud 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 car les cellules périphériques sont inhibées par les cellules atriales voisines (Boyett *et al.*, 2000).

Quatre types cellulaires distincts ont été décrits dans le nœud sinusal. Trois types cellulaires nodaux, représentés par les *elongated spindle cells*, les *spindle cells* et les *spider cells*, sont faiblement striés, distribués aléatoirement du centre vers la périphérie du sinus et présentent une activité électrique spontanée aux propriétés non-distinctes (Mangoni *et al.*, 2001 ; Verheijck *et al.*, 1998). Il existe aussi des *rod cells* qui de part leur striation, leur quiescence et leurs propriétés électrophysiologiques, sont de type atrial. Les cellules nodales typiques ont peu de myofilaments et de mitochondries, tandis que les cellules de transition, les *rod cells*, en ont plus, les rapprochant morphologiquement des cellules atriales. Les cellules sinusales sont entourées d'un abondant tissu conjonctif qui augmente en quantité avec l'âge. Chez les jeunes, 50% du volume du nœud sinusal est occupé par des

myocytes tandis que passé l'âge de 70 ans, ce pourcentage peut être seulement de 10% (Davies, 1983). 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 en collagène.

Le PA des cellules sinusales est caractérisé par trois propriétés principales (Cho *et al.*, 2003 ; Figure 2) : (i) un potentiel diastolique maximal faible (PDM $\approx$ -50 à -60 mV), (ii) une dépolarisation diastolique (DD) spontanée et lente et (iii) un PA dont la phase de dépolarisation est lente, l'amplitude faible et la durée longue.

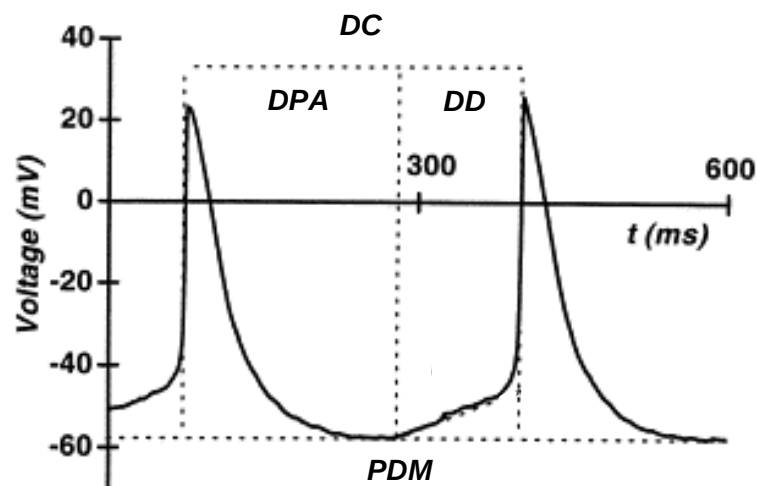


Figure 2 : Potentiels d'action enregistrés dans les cellules du nœud sinusal chez la souris adulte. PDM, potentiel diastolique maximal ; DC, durée du cycle ; DPA, durée du potentiel d'action, DD, dépolarisation diastolique. D'après Mangoni *et al.*, 2001.

L'activité électrique des cellules du nœud sinusal évolue graduellement du centre vers la périphérie. Les cellules sinusales centrales ont un PDM faible, une pente de dépolarisation diastolique forte, une vitesse de dépolarisation du PA lente, une amplitude du PA faible et une durée du PA longue. En allant vers la périphérie du nœud et ensuite vers le tissu atrial, le PDM s'hyperpolarise, la pente de dépolarisation diastolique est plus faible, la vitesse de dépolarisation du PA est plus rapide, l'amplitude du PA est plus grande et la durée du PA plus courte (Figure 3, page 6).

Comme chez les plus gros mammifères, la dépolarisation diastolique lente des cellules sinusales chez la souris dépend d'un équilibre entre l'activation de courants entrants dépolarisants et la désactivation de courants sortants repolarisants. Certaines protéines impliquées dans l'homéostasie calcique ou ionique cardiaque sont aussi primordiales.

L'hétérogénéité fonctionnelle observée entre la zone centrale et la périphérie du nœud sinusal s'explique par une expression variable des différents canaux ioniques impliqués dans la genèse du PA. La multiplicité des courants constitue un phénomène de

protection en cas de défaillance de l'un ou l'autre des mécanismes, tout comme l'existence de plusieurs zones *pacemaker* distinctes (Boyett *et al.*, 2000).

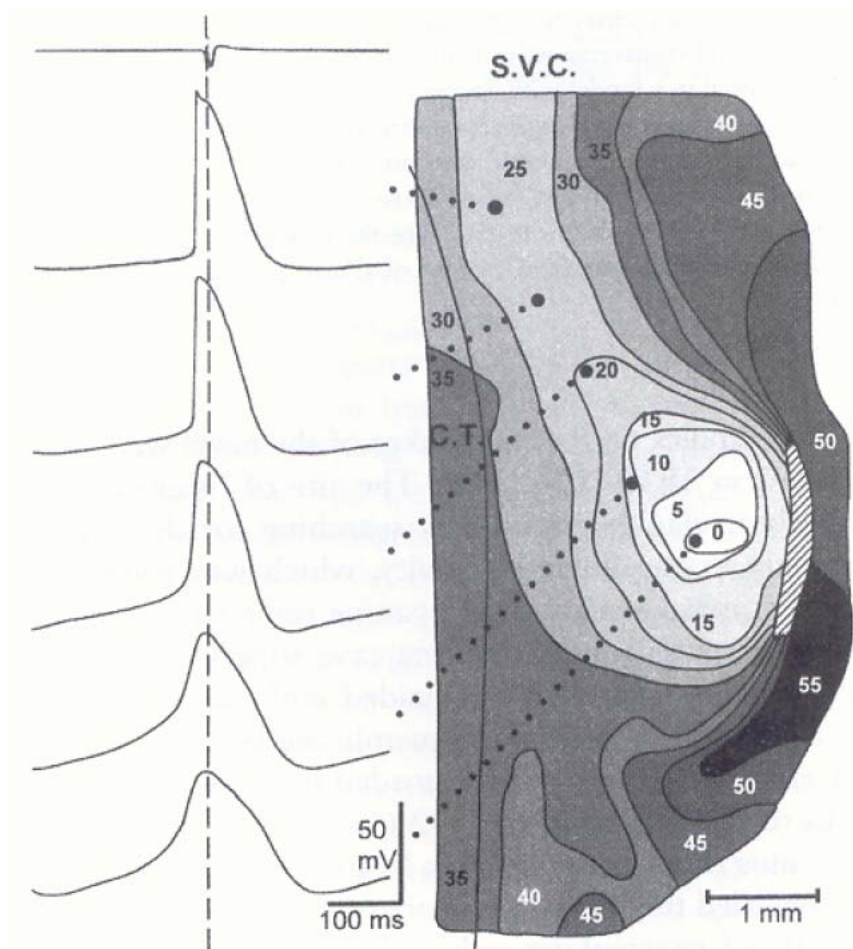


Figure 3 : Carte de propagation de l'excitation dans le nœud sinusal chez le lapin. Les traits délimitent des zones excitées par pas de 5 ms. Les nombres correspondent au temps d'activation en ms. La forme des potentiels d'action enregistrés du centre du nœud au tissu atrial sont figurés à gauche. Vers la périphérie, les potentiels d'action ont une amplitude et une $dV/dt_{\max}$ augmentées tandis que la fréquence de dépolarisation diastolique diminue. D'après Janse *et al.*, 1976.

2. Canaux ioniques participant à la dépolarisation diastolique

Cinq courants dépolarisants principaux ont été détectés à ce jour dans les cellules sinusales : le courant *pacemaker* I_f , les courants calciques $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ et les courants sodiques I_{Na} et I_{st} (*st*, *sustained*), chacun d'entre eux étant générés par des canaux ioniques aux propriétés spécifiques. La repolarisation des cellules sinusales dépend de plusieurs courants potassiques distincts.

a. Canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques (HCN)

La phase initiale de la dépolarisation diastolique est permise grâce à l'activation du courant *pacemaker* I_f (f pour "funny") généré par les canaux HCN activés par l'hyperpolarisation membranaire (Brown *et al.*, 1979). Ce courant apparaît pour des potentiels autour de -50 mV dans le nœud sinusal (Mangoni & Nargeot, 2001 ; Cho *et al.*, 2003) bien au dessus du potentiel de repos des cardiomyocytes contractiles. I_f est fortement exprimé dans le nœud sinusal et sa densité est plus importante dans les grosses cellules périphériques du nœud. I_f est aussi détectable dans le myocarde contractile mais en densité plus faible et pour des potentiels plus négatifs. Quatre gènes codent pour les canaux cationiques HCN: *HCN1*, *HCN2*, *HCN3*, *HCN4*. Des expériences d'hybridation *in situ* chez la souris adulte ont permis de mettre en évidence l'expression de trois types de canaux différents : *HCN1*, *HCN2* et *HCN4*. L'expression la plus forte est celle de *HCN4*, suivie de *HCN2* et enfin *HCN1* (Moosmang *et al.*, 2001). Ces isoformes diffèrent par leur potentiel d'activation et leur sensibilité à l'AMP_c (Wainger *et al.*, 2006). Le courant I_f semble avoir deux composantes, une rapide sous la dépendance de la sous-unité HCN2 et une lente dépendante d'HCN4 (Ludwig *et al.*, 1999). L'expression membranaire et les cinétiques des canaux HCN peuvent être modulées par une sous-unité régulatrice, la protéine transmembranaire KCNE2 (Qu *et al.*, 2004). I_f est un courant cationique mixte porté par les ions Na^+ et K^+ . Toutefois, le flux principal à travers les canaux I_f est composé d'ions Na^+ car leur perméabilité est supérieure à celle des ions K^+ . Plus récemment une perméabilité aux ions Ca^{2+} a été identifiée (Yu *et al.*, 2004).

Ces canaux possèdent un domaine de liaison à l'AMPc qui permet une modulation du courant I_f en fonction de la concentration cellulaire en AMPc. La liaison à l'AMPc induit un déplacement de la dépendance au potentiel des canaux HCN vers des potentiels plus positifs induisant une augmentation de l'amplitude du courant I_f . Lors d'une stimulation catécholaminergique des récepteurs β adrénergiques, l'augmentation de la concentration en AMPc accélère la vitesse de dépolarisation diastolique des cellules sinusales. Au contraire, une diminution de la concentration cellulaire en AMPc, lors d'une stimulation muscarinique par l'acétylcholine, induit une baisse de l'activité des canaux HCN et ralentit dès lors la fréquence cardiaque. Cette sensibilité à l'AMPc est un élément essentiel de la modulation de la fréquence cardiaque lors d'une stimulation du système sympathique ou parasympathique.

b.

Canaux calciques dépendant du potentiel

Ces canaux constituent la voie principale d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules *pacemaker*. Deux familles distinctes ont été décrites les canaux Ca^{2+} de type T et ceux de type L (Ono & Iijima, 2005).

L'activation du courant I_f permet d'atteindre le seuil d'activation des canaux Ca^{2+} de type T qui s'activent à des potentiels plus négatifs que les canaux de type L (Figure 4, page 9). Le courant $I_{\text{Ca,T}}$ a une activation maximale à -40 mV (Cho *et al.*, 2003). Leur inactivation est rapide et dépendante du potentiel. Ces canaux sont formés par plusieurs sous-unités, une sous-unité α_1 ($\text{Ca}_v3.X$) formant le pore du canal associée à des sous-unités régulatrices, une β , une $\alpha_2\delta$ et une sous-unité γ (Cohen *et al.*, 2005).

Une forte expression des transcrits de $\text{Ca}_v3.1$ et une expression plus faible de ceux de $\text{Ca}_v3.2$ ont été relevées dans le nœud sinusal chez la souris, tandis que les transcrits de $\text{Ca}_v3.3$ n'ont pas été détectés (Bohn *et al.*, 2000). La discrimination entre la participation de l'une ou l'autre de ces sous-unités au courant $I_{\text{Ca,T}}$ peut être faite dans certaines conditions grâce à leur sensibilité différentielle aux ions Ni^{2+} . Les canaux $\text{Ca}_v3.1$ sont moins sensibles au blocage par les ions Ni^{2+} que les canaux $\text{Ca}_v3.2$. Enfin ces canaux sont insensibles à la stimulation β adrénergique et aux dihydropyridines (DHPs) contrairement aux canaux de type L.

Les canaux Ca^{2+} de type L sont largement exprimés dans les tissus cardiaques. Le rôle fondamental de ces canaux réside dans l'initiation de la contraction myocardique. Ils s'activent pour des potentiels de membrane compris entre -50 et -30 mV et possèdent une inactivation dépendante à la fois du Ca^{2+} et du potentiel. Dans le nœud sinusal, la densité et les cinétiques d' $I_{\text{Ca,L}}$ sont régulées par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase dépendante du complexe Calcium/Calmoduline. Ils sont activés par la phosphorylation dépendante de la PKA. Les canaux Ca^{2+} de type L sont sensibles aux antagonistes DHPs comme la nifedipine et aux agonistes comme le BayK-8644 (Mangoni *et al.*, 2006). Ces canaux sont constitués par une sous-unité α_1 centrale formant le pore associée à différentes sous-unités accessoires ($\alpha_2\delta$, β et γ). A ce jour, quatre sous-unités α_1 ont été clonées, constituant la famille des $\text{Ca}_v1.X$. Seules $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$ sont exprimées dans le système cardiovasculaire, la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ étant le déterminant moléculaire majoritaire d' $I_{\text{Ca,L}}$. La sous-unité $\text{Ca}_v1.3$, après avoir été considérée comme étant spécifique des neurones et des cellules neuroendocrines, a été identifiée dans l'oreillette et le nœud sinusal (Mangoni *et al.*, 2006). Cette sous-unité forme des canaux qui ont un seuil d'activation plus bas (Figure 4) et une sensibilité aux DHPs plus faible que ceux formés à partir de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$. Par ailleurs, leur cinétique d'inactivation est plus lente que celle des canaux $\text{Ca}_v1.2$. Chez la souris, bien que l'expression des transcrits de $\text{Ca}_v1.3$ ait été détectée à un niveau plus faible

par rapport à ceux de $Ca_v1.2$ (ceux de $Ca_v1.1$ et $Ca_v1.4$ ne sont pas détectés ; Bohn *et al.*, 2000), la contribution de $Ca_v1.3$ dans l'automatisme cardiaque est majeure (Zhang *et al.*, 2002 ; Mangoni *et al.*, 2003). Des modèles de souris invalidées pour ces sous-unités ont permis de démontrer *in vivo* le rôle des canaux calciques dans l'automatisme et la conduction de l'influx électrique cardiaque. Nous présenterons ces modèles dans des parties ultérieures du manuscrit.

Dans le nœud sinusal, l'activité des canaux calciques de type L est régulée par le niveau basal de phosphorylation qui dépend à la fois de la PKA et de la protéine kinase II activée par le complexe Calcium/Calmoduline, CaMKII (Petit-Jacques *et al.*, 1993 ; Vinogradova *et al.*, 2000). Il a été montré que dans les myocytes ventriculaires la CaMKII facilite l'ouverture des canaux en réponse à une dépolarisation membranaire ou une entrée de Ca^{2+} modulant ainsi l'amplitude et l'inactivation du courant $I_{Ca,L}$ (Yuan *et al.*, 1994 ; Xiao *et al.*, 1994 ; Dzura *et al.*, 2000). Dans le nœud sinusal, une activité intacte de la CaMKII est nécessaire à l'automatisme compte tenu que les inhibiteurs de cette kinase abolissent quasiment l'automatisme dans les cellules sinusales de lapin (Vinogradova *et al.*, 2000). Par ailleurs, un modèle de souris transgénique a récemment permis de montrer que l'inhibition de cette kinase induisait un ralentissement de la conduction AV (Khoo *et al.*, 2005).

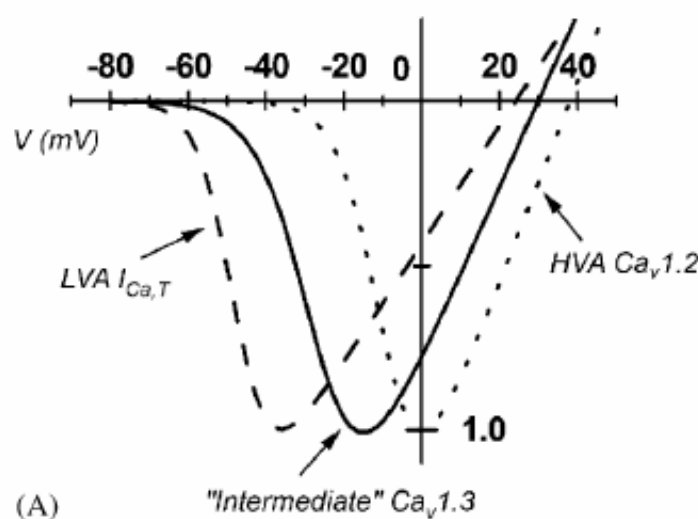


Figure 4 : Dépendance au potentiel de l'activation d' $I_{Ca,T}$ et d' $I_{Ca,L}$ générés par les sous-unités $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$. Les courbes I-V présentées ont été calculées à partir de données expérimentales. $I_{Ca,T}$ présente le seuil d'activation le plus bas (pointillés larges). Les canaux $Ca_v1.2$ génèrent le courant HVA $I_{Ca,L}$ (ligne continue) s'activant le plus tardivement, tandis que le courant $I_{Ca,L}$ médié par la sous-unité $Ca_v1.3$ constitue une composante aux propriétés intermédiaires adaptée à la genèse de la dépolarisation diastolique. HVA, high voltage activated ; LVA, low voltage activated. D'après Mangoni *et al.*, 2006.

En résumé, il semblerait que le courant $I_{Ca,T}$ contribue à la phase précoce de la dépolarisation diastolique alors que le courant $I_{Ca,L}$, via la sous-unité $Ca_v1.3$, est impliqué dans sa phase terminale. La sous-unité $Ca_v1.2$, s'activant à des potentiels encore plus dépolarisés (Koschak *et al.*, 2001), contribuerait quant à elle à la phase terminale de la dépolarisation diastolique et à la dépolarisation du PA.

Enfin il a été suggéré qu'une libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) par les récepteurs à la Ryanodine peut survenir lors de la dépolarisation diastolique et activer l'échangeur Na^+-Ca^{2+} (NCX) pour produire un courant entrant qui participe à la dépolarisation des cellules sinusales (Lakatta *et al.*, 2004). Ce même mécanisme dans les myocytes ventriculaires est responsable de la survenue de troubles du rythme sous forme de post-dépolarisations retardées. Les protéines de l'homéostasie calcique sont plus exprimées en périphérie du nœud sinusal que dans le centre (Musa *et al.*, 2002). Par conséquent, fonctionnellement, le déclenchement d'une activité *pacemaker* par les cellules centrales du nœud dépend moins de la libération de Ca^{2+} par le RS (Lancaster *et al.*, 2004).

c. Canaux sodiques dépendant du potentiel

Les canaux sodiques dépendant du potentiel sont exprimés de manière variable dans les cellules *pacemaker* du nœud sinusal. Ils sont fortement exprimés dans les grosses cellules de la périphérie du nœud et plus faiblement dans les petites cellules du centre. En accord avec cette expression différentielle, l'activité *pacemaker* en périphérie du nœud sinusal peut être ralentie par le blocage d' I_{Na} par la tetrodotoxine (TTX) mais l'activité *pacemaker* issue du centre est insensible à l'application de TTX (Kodama *et al.*, 1997).

Deux courants sodiques I_{Na} transitoires distincts, TTX-sensible et TTX-résistant, ont récemment été décrits dans les cellules sinusales murines adultes (Lei *et al.*, 2004). Ces courants s'activent à la fin de la dépolarisation diastolique et atteignent leur pic pendant la phase de dépolarisation du potentiel d'action. Le courant TTX-sensible a été mesuré à la fois dans les cellules de petite taille (supposées centrales) et dans les cellules de grande taille (supposées périphériques). Il a été suggéré que comme la courbe d'inactivation à l'état stable de ce courant est déplacé vers des potentiels plus positifs par rapport au courant TTX-résistant, il participerait à la dépolarisation diastolique des cellules sinusales. L'expression des sous-unités neuronales des canaux sodiques $Na_v1.1$ et $Na_v1.3$ dans le nœud sinusal de la souris concorde avec leurs rôles potentiels dans la genèse de ce courant (Maier *et al.*, 2003 ; Lei *et al.*, 2004). Le courant TTX-résistant a une densité qui augmente avec la taille

des cellules (et donc du centre vers la périphérie du sinus). Ce courant est médié par la sous-unité $\text{Na}_v1.5$ dont l'expression n'a été détectée que dans les cellules de grande taille (périphériques) chez la souris (Lei *et al.*, 2004). A de faibles concentrations (10 ou 100 nM), la TTX diminue la pente de la dépolarisation diastolique et ralentit la vitesse de dépolarisation maximale du PA dans les cellules centrales et périphériques. A de forte concentration (1-30 μM), elle provoque non-seulement un ralentissement du rythme, mais aussi de la conduction du PA des cellules périphériques vers les cellules atriales pouvant conduire à des blocs sino-atriaux. Ces dernières anomalies correspondent aux symptômes de dysfonction sinusale, notamment observés dans des familles où des mutations du gène *SCN5A* ont été identifiées (Benson *et al.*, 2003).

Ces sous-unités principales s'associent à des sous-unités auxiliaires $\text{Na}_v\beta$ (-1, -2, -3 et -4) pour générer le courant sodique cardiaque. Chez la souris les quatre types de sous-unités ont été détectées dans le nœud sinusal (Maier *et al.*, 2003).

d. Canaux générant le courant sodique entrant soutenu

La présence d'un courant sodique entrant dépendant du potentiel et activé par la dépolarisation a été rapportée dans les cellules *pacemaker* et dénommé I_{st} . Ce courant est activé pour des potentiels négatifs autour de -70 mV, et est maximal autour de -50 mV. Il est par ailleurs activé lors de stimulations β -adrénergiques (Guo *et al.*, 1997 ; Mitsuiye *et al.*, 2000). I_{st} est distinct d' I_{Na} , car il est insensible à la TTX et est bloqué par les dihydropyridines, ainsi que partiellement par les cations divalents comme les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Ni^{2+} . Les canaux unitaires sont perméants aux ions Na^+ . L'identité moléculaire de ce courant est à ce jour inconnue. Il a été proposé par Guo *et al.* (1997) que ce courant soit généré par un nouveau type de canaux calciques, ce qui serait en accord avec leur sensibilité aux DHPs.

Enfin il existe une pompe Na^+/K^+ générant un courant net sortant dans les cellules *pacemaker*. Ce courant n'est pas responsable de la dépolarisation diastolique mais il a pour rôle de stabiliser l'activité des cellules nodales en limitant les effets des courants entrants (Sakai *et al.*, 1996).

e.

Canaux potassiques dépendant du potentiel

Trois courants potassiques dépendant du potentiel ont été mis en évidence dans les cellules du nœud sinusal, la composante rapide du courant rectifiant retardé (I_{Kr}), sa composante lente (I_{Ks}) et un courant sortant transitoire (I_{to}). Ces courants sont responsables de la repolarisation du PA.

Dans les cellules *pacemaker* isolées du nœud sinusal, I_{Kr} est activé par la dépolarisation autour de -50 mV, est maximal entre -20 et 10 mV et produit une rectification entrante. La dépolarisation membranaire accélère à la fois l'activation et l'inactivation de ce courant. Pour des potentiels de membrane positifs supérieurs à 10 mV, l'inactivation du courant compense l'activation générant une courbe courant-potentiel ayant une pente négative. Lorsque le potentiel de membrane retrouve des valeurs plus négatives, les courants de queue de désactivation d' I_{Kr} sont enregistrés. Les courants de queue sont dus au retour rapide d'inactivation des canaux, suivie par leur fermeture temps dépendante pour des potentiels de membrane négatifs (Clark *et al.*, 2004). I_{Kr} est bloqué par les antiarythmiques de classe III comme l'E4031 et le dofétilide qui sont couramment utilisés pour étudier les propriétés cardiaques de ce courant. De nombreux autres médicaments à visée non cardiaque peuvent également inhiber I_{Kr} (Tamargo *et al.*, 2004). Ce courant est généré par des canaux appartenant à la famille ERG (*ether-à gogo related gene*) homologue au canal *ether-a-go-go* identifié chez *Drosophila melanogaster*. Trois membres ont été clonés nommés ERG1 à 3, mais seul ERG1, codé par le gène *KCNH2* est retrouvé dans le cœur. Dans le nœud sinusal murin, trois isoformes de ERG1 sont exprimés (1a, 1a' et 1b). La contribution de chacune de ces isoformes au courant I_{Kr} reste toutefois à déterminer. L'activation et la désactivation du courant I_{Kr} contribuent respectivement à la repolarisation du PA et à la dépolarisation diastolique (Cho *et al.*, 2003 ; Clark *et al.*, 2004).

Le courant I_{Ks} se distingue d' I_{Kr} par sa cinétique d'activation plus lente et sa désactivation plus rapide. Il est par ailleurs bloqué spécifiquement par le chromanol 293B. Le canal générant I_{Ks} est formé de 8 sous-unités : 4 sous-unités α (KvLQT1) codées par le gène *KCNQ1*, associées à 4 sous-unités β (minK) codées par le gène *KCNE1*. L'expression d' I_{Ks} et d' I_{Kr} est hétérogène dans le nœud sinusal. Chez le lapin, il a été montré que la densité de ces courants est supérieure dans les grosses cellules périphériques du nœud (Lei *et al.*, 2001). Il existe aussi des différences entre espèces car par exemple I_{Ks} n'a pas été enregistré dans les cellules sinusales chez la souris (Cho *et al.*, 2003). L'absence de ce courant est en accord avec la fonction sinusale conservée chez les souris *KCNQ1*^{-/-} et *KCNE1*^{-/-} (Casimiro *et al.*, 2001 ; Kupersmidt *et al.*, 1999 ; Cho *et al.*, 2003).

Enfin le courant transitoire sortant I_{to} est activé et inactivé rapidement par la dépolarisation. Il possède une pharmacologie distincte des autres courants K^+ car il est sensible à la 4-aminopyridine (4-AP). Deux composantes aux cinétiques distinctes ont été mises en évidence dans les cellules du nœud sinusal, $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$ qui ont respectivement une inactivation rapide et lente. Comme pour I_{Kr} et I_{Ks} , l'expression d' I_{to} est hétérogène dans le nœud sinusal. L'automatisme du tissu *pacemaker* issu de la périphérie du nœud est inhibé plus fortement par la 4-AP que celui du tissu issu du centre (Boyett *et al.*, 1998). Ce résultat est en accord avec la plus forte expression d' $I_{to,f}$ dans les grosses cellules de la périphérie par rapport aux petites cellules du centre du nœud sinusal (Honjo *et al.*, 1999). Les canaux générant I_{to} appartiennent à une famille de protéines codées par les gènes *KCNA4* et *KCND2/D3*. L'invalidation de la sous-unité α , $K_v1.4$ (gène *KCNA4*), abolit le courant $I_{to,s}$ chez la souris (London *et al.*, 1998). Le courant $I_{to,f}$ est généré par l'association en hétéromultimères des sous-unités α , $K_v4.2$ et $K_v4.3$ (codées respectivement par *KCND2* et *KCND3*) qui est modulée par une protéine régulatrice, KchIP2 (Guo *et al.*, 2002). Cette sous-unité modifie les cinétiques d'inactivation du canal et son expression à la membrane.

Chez la souris, deux autres courants repolarisants existent : $I_{K,slow}$ (ou I_{Kur}) et I_{ss} (ss, *steady-state*) (Cho *et al.*, 2003). I_{ss} est caractérisé par son absence d'inactivation. Chez la souris, l'identité moléculaire de ces courants n'est pas connu dans le nœud sinusal. Dans le ventricule, le courant $I_{K,slow}$ est généré par les sous-unités $K_v1.5$ et $K_v2.1$ codées respectivement par les gènes *KCNA5* et *KCNB1*. Chez l'homme, seule la sous-unité $K_v1.5$ existe et elle est majoritairement exprimée dans l'oreillette (Li *et al.*, 1996).

f. Canaux potassiques indépendant du potentiel

Le courant activé par l'acétylcholine ($I_{K,Ach}$) est fortement exprimé dans le nœud sinusal et les oreillettes. Ce courant est activé par la stimulation des récepteurs à l'acétylcholine ou à l'adénosine qui sont couplés aux protéines G. Son activation provoque la stabilisation du potentiel de membrane à des valeurs proches du potentiel d'équilibre au K^+ , ce qui demande plus de courant entrant pour atteindre le seuil de déclenchement du PA. Dans le cœur, $I_{K,Ach}$ est généré par les canaux Kir3.1 (codés par le gène *KCNJ3*) et Kir3.4 (gène *KCNJ5*) qui forment des tétramères (Wickman *et al.*, 2002). Les souris invalidées pour Kir3.4 (Kir3.4^{-/-}) ne possèdent plus d' $I_{K,Ach}$. Ces souris, comme les Kir3.1^{-/-} ne présentent pas de réponse à des stimulations pharmacologiques destinées à activer $I_{K,Ach}$ (Wickman *et al.*, 1998 ; Bettahi *et al.*, 2002).

Dans les cellules sinusales de lapin, il a été mis en évidence le courant K^+ ATP dépendant, $I_{K,ATP}$ (Han *et al.*, 1996). Ce courant est activé lorsque la concentration intracellulaire d'ATP est diminuée. En hyperpolarisant le potentiel diastolique maximal, il peut ralentir le rythme *pacemaker*. Le rôle exact d' $I_{K,ATP}$ en conditions physiologiques n'a pas été mis en évidence à ce jour. Il pourrait cependant ralentir le rythme cardiaque en conditions ischémiques, contribuant à la protection du myocarde contre la sidération.

Enfin, il est communément admis que les cellules *pacemaker* ne possèdent pas (ou peu) de courant I_{K1} tandis que sa densité est forte dans le myocarde contractile et le réseau de Purkinje (Irisawa *et al.*, 1993; Nerbonne & Kass, 2005). Ce courant est responsable du potentiel diastolique négatif des cellules contractiles, et son absence permet aux cellules automatiques d'avoir un potentiel diastolique maximal plus positif. Chez la souris, un faible courant I_{K1} a été enregistré dans les cellules sinusales (Cho *et al.*, 2003). L'identité moléculaire de ce courant repose sur deux sous-unités, Kir2.1 (*KCNJ2*) et Kir2.2 (*KCNJ12*) (Nerbonne & Kass, 2005).

3. Mécanisme physiologique de la dépolarisation diastolique

La dépolarisation diastolique des cellules *pacemaker* résulte de l'activité de plusieurs canaux, pompes ou échangeurs ioniques dont les principales caractéristiques viennent d'être détaillées. La figure 5 (page 15) récapitule la séquence d'activation des principaux courants ioniques participant au potentiel d'action des cellules sinusales. La figure 6 (page 16) schématise ces différents déterminants moléculaires dans une cellule *pacemaker* idéalisée. La génération de l'automatisme nécessite l'activation d'un courant entrant à la fin de la phase de repolarisation pour initier la dépolarisation diastolique. Au moment de la diminution d' I_{Kr} , la dépolarisation diastolique est générée par l'association d' I_f , I_{st} , $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$ et I_{Na} . Par ailleurs, la libération diastolique de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique participe à la régulation de la fréquence de dépolarisation des cellules *pacemaker*.

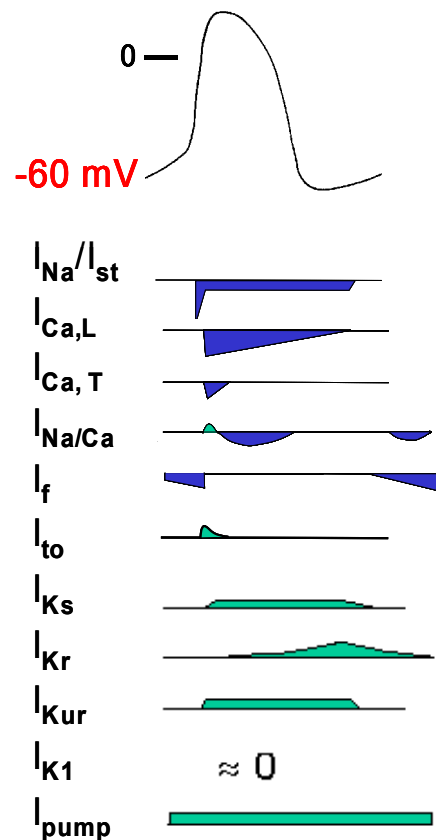


Figure 5 : Séquence d'activation des principaux courants ioniques participant au potentiel d'action sinusal chez la souris adulte. Les courants entrants dépolarisants sont en bleu, les courants sortants repolarisants en vert.

La majorité des données qui ont permis de décrypter les mécanismes cellulaires à l'origine de l'automatisme cardiaque a été obtenue grâce à l'étude de cellules du nœud sinusal de lapin et à la modulation pharmacologique des différents courants ioniques impliqués. Plus récemment l'émergence des modèles de souris transgéniques a permis de décrypter le rôle de différentes sous-unités constituant des protéines canal dans le cœur. Toutefois pour étudier leur rôle dans le nœud sinusal, il fallait pouvoir obtenir des cellules isolées viables chez la souris. Cet obstacle technique a été surmonté au début des années 2000, permettant de valider le déterminisme moléculaire de plusieurs sous-unités des canaux ioniques dans la genèse de l'automatisme cardiaque (Mangoni & Nargeot, 2001 ; Zhang *et al.*, 2002).

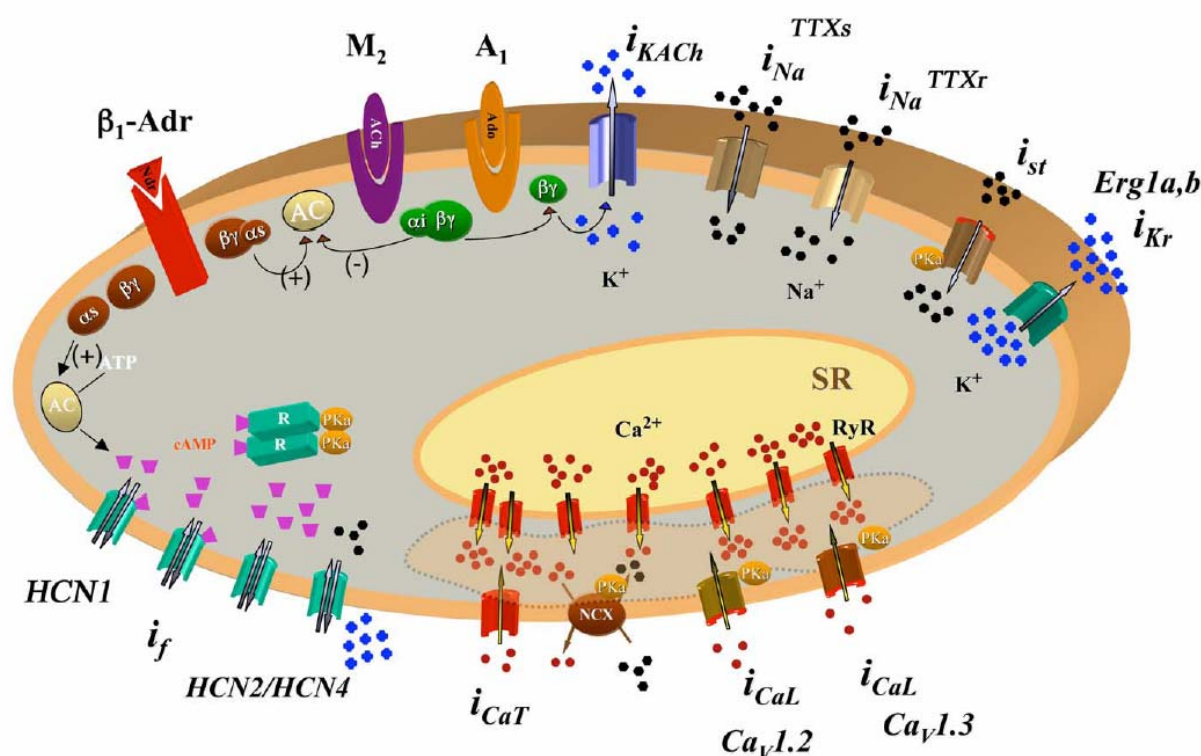


Figure 6 : **Organisation cellulaire des canaux ioniques dans une cellule *pacemaker* idéale.**
 Les différents types de canaux ioniques sont matérialisés par des couleurs différentes et à côté est indiqué le nom des courants qu'ils génèrent. Les points noirs correspondent aux ions Na^+ , les bleus aux ions K^+ , les rouges aux ions Ca^{2+} .
 Les principales protéines impliquées dans la régulation autonome de l'activité *pacemaker* sont présentées. Les récepteurs à la noradrénaline (Ndr), à l'Ach et à l'adénosine (Ado) sont figurés avec à proximité les sous-unités activatrices (α_s) et inhibitrices (α_i) de la protéine G. L'AMPc produit par l'activité de l'adénylate cyclase (AC) se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA pour aller moduler la fonction de différents canaux. La proximité des canaux calciques, de l'échangeur NCX et des récepteurs à la ryanodine est représentée constituant un compartiment privilégié de la régulation cellulaire par le calcium. D'après Couette *et al.* 2006.

Le courant I_{Kr} contrôle la repolarisation du PA des cellules sinusales. De ce fait, I_{Kr} est un déterminant majeur du potentiel diastolique maximal de ces cellules et définit la séquence d'activation des différents courants dépendant du potentiel qui vont participer à la dépolarisation diastolique. Par ailleurs, I_{Kr} joue un rôle fondamental dans le couplage électrique des cellules *pacemaker* avec les cellules atriales adjacentes (Verheijck *et al.*, 2002).

Le courant I_f est un élément clé de l'initiation et du contrôle de la dépolarisation diastolique. Trois arguments majeurs sont en faveur de cette affirmation. Tout d'abord I_f s'active très précocement lors de la dépolarisation diastolique pour des potentiels proches du

potentiel diastolique maximal (PDM). Puis tous les inhibiteurs pharmacologiques d' I_f ont un effet chronotrope négatif sur le tissu sinusal ou les cellules *pacemaker* isolées. Enfin la dysfonction sinusale présente chez la souris après invalidation des gènes codant pour les canaux HCN constitue un argument supplémentaire en faveur du rôle primordial d' I_f dans la genèse de l'automatisme cardiaque (Stieber *et al.*, 2004).

La participation d' $I_{Ca,L}$ à la dépolarisation diastolique varie selon la taille des cellules *pacemaker* (Kodama *et al.*, 1997). Chez le lapin, $I_{Ca,L}$ est essentiel à la genèse de l'activité *pacemaker* par les petites cellules du centre du nœud sinusal tandis que dans les cellules de la périphérie son défaut peut être compensé par I_{Na} qui y est fortement exprimé. Le début de l'activation d' $I_{Ca,L}$ se fait dans la phase précoce de la dépolarisation diastolique et augmente jusqu'au seuil de déclenchement du PA (Verheijck *et al.*, 1999).

$I_{Ca,T}$ a été mis en évidence dans tous les tissus cardiaques doués d'automatisme, le nœud sinusal, le nœud AV et le réseau de Purkinje. Bien que la disponibilité des canaux de type T soit faible au PDM des cellules sinusales, $I_{Ca,T}$ pourrait participer à l'automatisme en conditions physiologiques lorsque le PDM est hyperpolarisé (par exemple lors d'un tonus vagal fort). Dans les cellules sinusales l'activation d' $I_{Ca,T}$ lors de la dépolarisation diastolique peut modifier localement la signalisation calcique et entraîner l'activation de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX1) générant un courant net entrant participant à la phase terminale de la dépolarisation diastolique. Comme dans les cellules *pacemaker*, les canaux calciques de type T, les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique et l'échangeur NCX sont proches, il est envisageable qu'un couplage fonctionnel existe entre ces protéines. Un tel couplage permettrait d'expliquer comment un courant calcique de faible intensité ($I_{Ca,T}$) peut générer un courant entrant plus important grâce à l'effet amplificateur du relargage de calcium par le RS et l'activation de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (Mangoni *et al.*, 2006).

La composante TTX-sensible du courant sodique (I_{Na}) est activée à la fin de la dépolarisation diastolique. Elle doit de ce fait participer à la pente de dépolarisation diastolique et au déclenchement du PA. La composante TTX-résistante contribue quant à elle à la propagation de l'influx électrique dans le nœud sinusal et à la conduction entre le nœud sinusal et le tissu atrial (Lei *et al.*, 2004).

En l'absence de données pharmacologiques et moléculaires sur le courant I_{st} , le rôle de ce courant dans le déclenchement de l'activité *pacemaker* a été précisé grâce à la modélisation mathématique de l'activité des cellules sinusales chez le rat et le lapin. I_{st} serait présent tout au long de la dépolarisation diastolique grâce à son seuil d'activation bas et son inactivation lente. Son rôle dépendrait toutefois de l'importance des courants I_f et I_{Na} . Dans les cellules centrales où ces courants ont des densités faibles, I_{st} permettrait d'accélérer le rythme sinusal en condition normale ou sous stimulation β -adrénergique, tandis que dans les cellules périphériques son rôle serait moindre (Shinagawa *et al.*, 2000).

Régulation par le système nerveux autonome

La régulation par le système nerveux autonome de l'activité électrique des cellules sinusales se fait par la modulation de canaux précédemment évoqués appartenant à 5 familles distinctes : les canaux activés par l'hyperpolarisation (I_f), les canaux potassiques générant les courants I_{Ks} et I_{Kr} , les canaux calciques de type L ($I_{Ca,L}$), le canal potassique activé par l'acétylcholine ($I_{K,Ach}$) et les canaux générant le courant entrant soutenu (I_{st}) (Stieber *et al.* 2004). Le tonus sympathique augmente la pente de dépolarisation diastolique tandis que le tonus vagal produit l'effet l'inverse (voir Figure 7, page 19).

En plus de la modification des propriétés des canaux ioniques, le système nerveux autonome entraîne un déplacement du site *pacemaker* primaire. Lors d'une stimulation vagale, au lieu de prendre son origine au centre du nœud sinusal, l'activité *pacemaker* provient de la zone périphérique et d'une zone plus caudale. Au contraire, lors d'une stimulation adrénergique elle se déplace vers une zone plus basse du centre du nœud (Kléber *et al.*, 2001).

L'effet chronotrope positif de la stimulation sympathique est initié par l'activation des récepteurs β -adrénergiques qui à leur tour stimulent l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMPc permettant d'initier la cascade de signalisation cellulaire comprenant l'activation de la PKA et d'autres processus AMPc dépendants. L'AMPc favorise par action directe l'ouverture des canaux HCN et stimule les courants $I_{Ca,L}$ et I_{st} via une phosphorylation par la PKA (DiFrancesco *et al.*, 1994 ; Mangoni *et al.*, 2003 ; Mitsuiye *et al.*, 2000). L'AMPc facilite aussi le relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique dans la phase de dépolarisation diastolique (Rigg *et al.*, 2000 ; Vinogradova *et al.*, 2002). La phosphorylation des canaux calciques de type L facilite leur ouverture (McDonald *et al.*, 1994). Les canaux sodiques TTX-resistants sont sensibles à la phosphorylation par la PKA et la PKC (Li *et al.*, 1993). La stimulation adrénergique de ces canaux pourrait faciliter la conduction de la dépolarisation dans le nœud sinusal et du nœud vers les oreillettes. L'interaction entre les canaux calciques de type L, les canaux HCN et les récepteurs à la ryanodine dans la genèse de l'activité *pacemaker* laisse supposer que les mécanismes de régulation de ces canaux lors d'une stimulation adrénergique pourraient s'entremêler. Cette hypothèse demande toutefois à être démontrée expérimentalement.

Le rôle d' I_{Kr} et d' I_{Ks} dans la régulation β -adrénergique de l'activité *pacemaker* doit encore être étudié. Des études ont toutefois montré que l'adrénaline augmente fortement la densité des courants potassiques sur des préparations sinusales ou des cellules *pacemaker* isolées (Di Francesco *et al.*, 1979). La sensibilité d' I_{Kr} aux agonistes β -adrénergiques a été

montrée sur des myocytes ventriculaires mais pas sur des cellules sinusales à ce jour (Heath *et al.*, 2000).

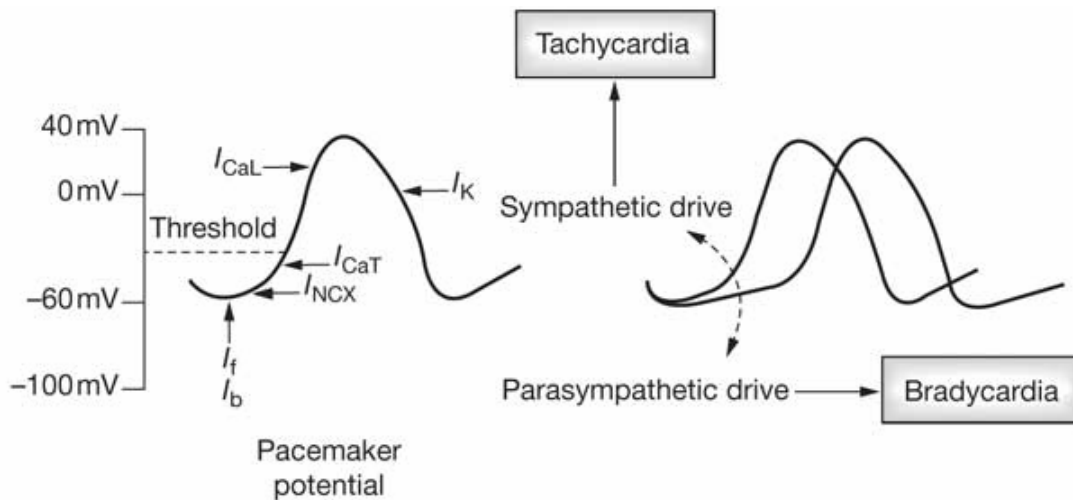


Figure 7: Modulation du potentiel d'action sinusal par le système nerveux autonome.
 I_f , courant *pacemaker* ou 'funny'; I_b , courant entrant soutenu (I_{st}); I_{Ca} , courant entrant calcique; I_K , courant sortant potassique; I_{NCX} , échangeur Na^+/Ca^{2+} . D'après Yusuf & Camm, 2005.

La libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses parasympathiques conduit à une réduction de la concentration cellulaire en AMPc, entraînant une déphosphorylation des canaux calciques de type L et des canaux responsables du courant I_{st} . De plus la réduction de la concentration en AMPc entraîne un déplacement de l'activation des canaux HCN vers des potentiels plus négatifs, diminuant le courant I_f (DiFrancesco *et al.*, 1988).

L'acétylcholine provoque aussi l'ouverture des canaux K^+ générant le courant $I_{K,Ach}$ (Sakmann *et al.*, 1983). Les souris invalidées pour les sous-unités Kir3.1 et Kir3.4 n'ont plus de courant $I_{K,Ach}$ dans le cœur. En conditions de base, leur fréquence cardiaque est légèrement plus élevée que celle des souris WT. Mais surtout la variabilité battement à battement de l'activité cardiaque est fortement atténuée chez les souris déficientes pour ces sous-unités. Comme la réponse à une stimulation cholinergique est fortement altérée chez ces souris, il est probable que la stimulation du courant $I_{K,Ach}$ soit responsable d'au moins la moitié de la réponse chronotrope négative observée lors d'une stimulation vagale (Wickman *et al.*, 1998 ; Bettahi *et al.*, 2002).

L'intégrité de la réponse à une stimulation muscarinique dépend du couplage des récepteurs muscariniques aux protéines G qui modulent l'activité de l'adénylate cyclase, de phospholipases ou directement de canaux ioniques. Plusieurs évidences expérimentales ont été apportées par l'étude de souris invalidées pour ces protéines. L'invalidation de la

protéine $G\alpha_0$ chez la souris n'altère pas la réponse à l'isoprénaline des canaux calciques de type L. Par contre, lors d'une stimulation muscarinique, la réponse est presque entièrement abolie (Valenzuela *et al.*, 1997). Ces résultats démontrent que l'intégrité de la protéine $G\alpha_0$ est nécessaire à la transduction du signal depuis les récepteurs muscariniques jusqu'aux canaux calciques de type L. La diminution du courant $I_{Ca,L}$ est en partie responsable de la bradycardie observée lors d'une stimulation vagale. Chez la souris, les canaux K^+ activés par l'acétylcholine peuvent être activés directement par la sous-unité $\beta\gamma$ des protéines G. Une diminution de 50% de cette sous-unité dans le cœur entraîne chez la souris une diminution de la réponse bradycardisante attendue lors d'une stimulation parasympathique. Par ailleurs, ces souris ont une susceptibilité moindre au déclenchement de troubles du rythme auriculaire (Gehrmann *et al.*, 2002).

Les effets d'une stimulation muscarinique sur le nœud sinusal sont plus prononcés lorsque le tonus sympathique a au préalable accéléré le rythme sinusal. Ce phénomène est dénommé antagonisme accentué (Levy *et al.*, 1971). La synthèse de monoxyde d'azote (NO) lors d'une stimulation muscarinique semble être le mécanisme à l'origine du phénomène d'antagonisme accentué dans le nœud sinusal chez le chien (Sasaki *et al.*, 2000). Le NO stimule l'activité de la guanylate cyclase, et de ce fait la dégradation de l'AMPc par la phosphodiesterase II. L'invalidation de la NO synthase endothéliale chez la souris a permis de montrer que la régulation muscarinique d' $I_{Ca,L}$ passe également par la voie du NO (Han *et al.*, 1998). La NO synthase neuronale participe elle aussi aux effets bradycardisants de la stimulation vagale (Choate *et al.*, 2001).

Tout comme les récepteurs adrénergiques et muscariniques, les récepteurs à l'adénosine participent à la régulation de l'automatisme et de la conduction cardiaque. Chez l'homme, la stimulation des récepteurs à l'adénosine entraîne une bradycardie et un bloc atrioventriculaire (DiMarco *et al.*, 1983). Lorsque les récepteurs à l'adénosine (A_1 AR et A_3 AR) sont surexprimés dans le cœur chez la souris, des anomalies de la commande sinusale et de la conduction atrioventriculaire surviennent (Kirchhof *et al.*, 2003 ; Fabritz *et al.*, 2004). La surexpression du récepteur à l'adénosine de type A_1 entraîne un défaut d'accélération du rythme à l'effort sans atteinte de la fréquence cardiaque de base (Kirchhof *et al.*, 2003). Au contraire la surexpression du récepteur de type A_3 déprime fortement la fréquence cardiaque en conditions basales et ce défaut est partiellement compensé lors d'un exercice (Fabritz *et al.*, 2004). L'allongement de la conduction AV est similaire dans les deux modèles. Il semblerait donc que les récepteurs à l'adénosine de type A_1 atténueraient la réponse adrénergique tandis que les récepteurs de type A_3 participeraient à la régulation basale du rythme. Le ralentissement de la conduction chez ces souris pourrait s'expliquer

par l'activation des canaux K^+ dépendant de l'acétylcholine et par l'inhibition des effets β -adrénergiques sur le courant calcique de type L.

Des souris invalidées pour les sous-unités $Ca_v2.2$ et $Ca_v2.3$ des canaux calciques de type N ont été récemment développées. Ces deux lignées présentent des altérations de fréquence et de rythme cardiaque. Aucune expression de la sous-unité $Ca_v2.2$ n'a été mise en évidence dans le cœur à ce jour mais elle est connue pour permettre la libération des neurotransmetteurs dans les terminaisons nerveuses des neurones sympathiques. La perte de $Ca_v2.2$ entraîne une diminution de l'activité sympathique sur le cœur sans atteinte du contrôle parasympathique. Toutefois des mécanismes compensateurs doivent être mis en œuvre chez ces animaux car leur fréquence cardiaque et leur pression artérielle moyenne sont plus élevées que chez les WT. Ils n'ont cependant pas été élucidés pour l'instant. Il est toutefois connu que ces mécanismes ne mettent pas en jeu une augmentation des récepteurs β -adrénergiques ou une accumulation d'adrénaline dans le plasma (Ino *et al.*, 2001). Ce premier modèle de souris démontre l'importance de la sous-unité $Ca_v2.2$ dans la régulation sympathique de la fréquence cardiaque.

L'expression du transcrit et de la protéine codée par $Ca_v2.3$ a été rapportée dans le cœur chez la souris (Lu *et al.*, 2004 ; Mitchell *et al.*, 2002). L'invalidation de cette sous-unité induit des arythmies sévères et une conduction intraventriculaire anormale (Lu *et al.*, 2004; Weiergraber *et al.*, 2005). La fréquence cardiaque est plus élevée chez les souris $Ca_v2.3^{-/-}$ liée à une augmentation du tonus sympathique. Cette sous-unité doit aussi être essentielle à l'activation et à la conduction de l'influx électrique dans le cœur car, après blocage du système nerveux autonome (par injection d'atropine et de propranolol), les anomalies de morphologie des ondes P et du complexe QRS perdurent (Weiergraber *et al.*, 2005). L'étude du phénotype cardiaque de cette souris laisse à penser que les canaux $Ca_v2.3$ sont plus importants dans la régulation neurohumorale de l'activité *pacemaker* et de la conduction AV que dans la génération de la dépolarisation diastolique dans les cellules du nœud sinusal.

La sous-unité régulatrice $\alpha2\delta2$ des canaux calciques est exprimée fortement dans les ganglions sympathiques chez la souris (Ivanov *et al.*, 2004). L'invalidation de cette sous-unité entraîne une bradycardie légère en condition de base, et un ralentissement moindre de la fréquence cardiaque lors d'une anesthésie à l'isoflurane. Les autres paramètres de l'électrocardiogramme ne sont par ailleurs pas modifiés. Les anesthésiques volatiles ont un effet central sur le système nerveux. Ils réduisent la transmission par les synapses excitatrices en diminuant la concentration intrasynaptique en glutamate. Chez les souris $\alpha2\delta2^{-/-}$ la fonction des canaux calciques permettant la libération normale des neurotransmetteurs est altérée. Cela expliquerait pourquoi, lors d'une anesthésie à

l'isoflurane, l'effet bradycardisant serait moindre chez les souris invalidées, leur concentration synaptique en glutamate étant déjà basse à l'état basal (Ivanov *et al.*, 2004).

C. Conduction de l'influx électrique dans le cœur

L'activité électrique qui naît spontanément dans le nœud sinusal de KEITH et FLACK se propage aux oreillettes et au nœud auriculo-ventriculaire. La vitesse de propagation de cet influx est fortement ralentie dans le nœud AV avant de gagner le faisceau de His, ses branches et le réseau de Purkinje pour activer le myocarde ventriculaire.

La propagation de l'influx électrique dans le cœur dépend de trois principaux déterminants : (1) le couplage cellulaire assuré par des canaux jonctionnels, les connexines ; (2) l'excitabilité cellulaire dépendant principalement des canaux sodiques ($Na_v1.5$) et (3) l'architecture tissulaire comprenant la forme des cellules et le collagène interstitiel (fibrose) (Van Rijen *et al.*, 2005).

1. Du nœud sinusal vers les oreillettes

La vitesse de conduction de l'influx électrique est plus lente dans le nœud sinusal (2 à 5 cm par seconde) par rapport à celle mesurée dans le tissu atrial, ce qui favorise le risque de bloc intra-nodal. La vitesse de conduction est aussi plus lente au centre du nœud sinusal par rapport à la périphérie (Boyett *et al.*, 2000). Ces différences peuvent en partie être expliquées par les propriétés distinctes entre les cellules sinusales centrales et les cellules périphériques. En effet, la densité du courant I_{Na} est plus élevée en périphérie, ce qui peut participer à l'accélération de la vitesse de conduction dans cette zone. Par ailleurs, la disposition des cellules est de plus en plus organisée en allant vers la périphérie pouvant aussi faciliter la conduction de l'influx. Enfin, la transmission de l'influx électrique du nœud sinusal aux cellules atriales bordantes nécessite un délicat équilibre. En effet, si les cellules du nœud sinusal étaient parfaitement couplées aux cellules atriales, le potentiel hyperpolarisé de ces dernières pourrait inhiber la dépolarisation spontanée des cellules *pacemaker*. Mais d'un autre côté si la conduction était insuffisante du tissu sinusal vers le tissu auriculaire, la dépolarisation des cellules *pacemaker* ne pourrait pas permettre l'activation de la masse atriale. C'est pourquoi le couplage cellulaire au centre du nœud sinusal est certainement plus faible qu'en périphérie. Un faible couplage au centre

favoriserait l'initiation de l'influx électrique et un couplage plus étroit entre les cellules périphériques et les cellules atriales faciliterait la propagation de l'influx. Aucune évidence expérimentale n'existe toutefois à ce jour pour confirmer cette hypothèse (Verheijck *et al.*, 2001). Ces différences pourraient être permises par une composition variable en connexines des jonctions communicantes ou jonctions gap, entre les cellules.

Les cytoplasmes de deux cellules sont mis en relation par des canaux formés par l'association de deux connexons appartenant chacun à une des cellules (Figure 8). Chaque connexon est constitué d'un hexamère de connexines. Dans le cœur de mammifère, plusieurs connexines (Cx) sont exprimées : Cx40, Cx43, Cx45, Cx30.2 et Cx37. Cette dernière est spécifique aux cellules endothéliales tandis que les autres sont exprimées par les cardiomyocytes.

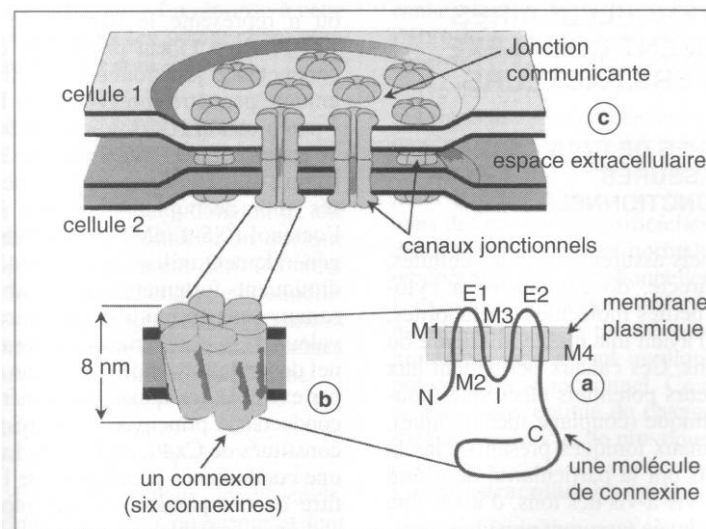


Figure 8: Représentation schématique d'une jonction communicante et de ses constituants D'après Gros *et al.*, 2002.

a : les connexines sont des protéines à quatre segments transmembranaires (M1 à M4).

b : les connexines s'assemblent en hexamères pour former des canaux appelés connexons.

c : les connexons de deux cellules adjacentes s'arriment dans l'espace extracellulaire pour former des canaux jonctionnels qui assurent une communication directe entre les cytoplasmes des deux cellules. Les canaux s'agrègent pour former des jonctions communicantes dans lesquelles l'espace extracellulaire est réduit à 2-3 nm.

Au centre du nœud sinusal, les connexines 45 et 30.2 sont majoritairement exprimées tandis que la connexine 40 est faiblement exprimée et la 43 absente. Au contraire en périphérie, ce sont les connexines 43 et 45 qui sont majoritairement retrouvées (Boyett *et al.*, 2006). Les canaux unitaires formés par les Cx40 et Cx43 possèdent des valeurs de

conductance bien plus élevées par rapport aux connexines 45 et 30.2 (respectivement de 180, 115, 32 et 9 pS) (Kreuzberg *et al.*, 2005). Ces différences pourraient permettre d'expliquer le meilleur couplage cellulaire à la périphérie du nœud sinusal, couplage qui permet la propagation de l'onde de dépolarisation aux oreillettes. Par ailleurs chez la souris, des cellules atriales faiblement couplées aux cellules sinusales s'immiscent dans la zone centrale du nœud. Le couplage de ces cellules pourraient également participer à la dépolarisation atriale (Verheijck *et al.*, 2001).

L'onde de dépolarisation qui naît au centre du nœud sinusal se propage en direction de la *crista terminalis* (CT) dans un plan parallèle, dans lequel la vitesse de propagation est plus rapide que perpendiculairement. L'arrivée d'une onde de dépolarisation massive sur la CT doit favoriser l'activation du tissu atrial (Boyett *et al.*, 2000). Chez la souris, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces (cochon, lapin, cobaye), la conduction de l'influx vers la CT se fait obliquement et caudalement plutôt que cranialement. Cette différence pourrait permettre de raccourcir le temps de conduction vers le nœud AV et aussi participer au court intervalle RR existant dans cette espèce (Verheijck *et al.*, 2001). Le passage par la CT est la voie de conduction commune pour l'activation des deux oreillettes, car l'influx électrique ne peut se propager à travers le septum interatrial. L'oreillette gauche est activée par la branche de Bachmann qui relie le nœud sinusal à l'oreillette gauche (Kléber *et al.*, 2001). La figure 9 permet de localiser chez la souris, certaines structures anatomiques citées précédemment.

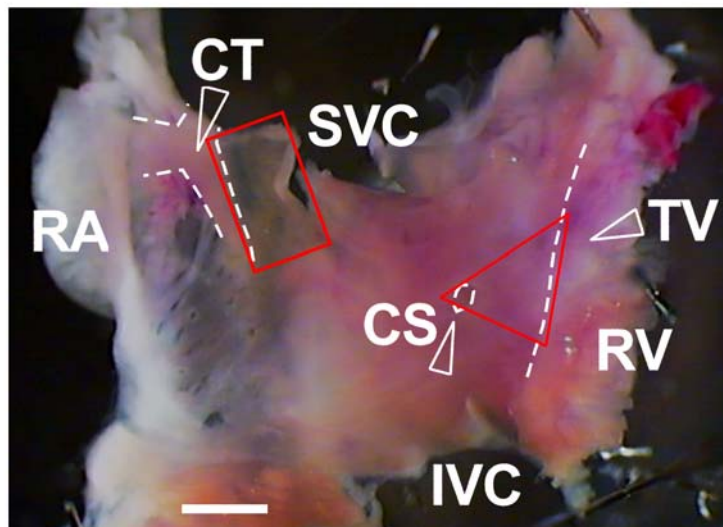


Figure 9 : Localisation anatomique du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire chez la souris. Le nœud sinusal et le nœud AV sont délimités respectivement par le rectangle et le triangle rouges. RA, oreillette droite ; CT, *crista terminalis* ; SVC, veine cave supérieure ; IVC, veine cave inférieure ; CS, sinus coronaire ; RV, septum ventriculaire droit ; TV, valve tricuspide. Echelle, 1 mm. D'après Marionneau *et al.*, 2005.

2. Du nœud sinusal vers le nœud auriculo-ventriculaire

Il a longtemps été supposé que des connexions spécifiques entre le nœud sinusal et le nœud AV pouvaient constituer des voies de conduction privilégiées entre ces deux centres de commande de l'activité électrique cardiaque. Toutefois, anatomiquement, aucune structure n'a été identifiée à ce jour.

Le nœud AV est caractérisé par une conduction lente, responsable du décalage entre l'activation des oreillettes et des ventricules (Meijler *et al.*, 1988). Sa longue 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. Le nœud AV sert par ailleurs de *pacemaker* subsidiaire lors de dysfonction sinusale ou de bloc de conduction entre les oreillettes et le nœud AV.

a. Propriétés des cellules du nœud auriculo-ventriculaire

Le nœud AV est localisé dans le triangle de Koch délimité par le sinus coronaire, la valve tricuspide et le septum interventriculaire droit (Figure 9, page 24). Les caractéristiques de l'activité électrique du nœud AV sont proches de celles du nœud sinusal (Figure 10, page 26) : le potentiel diastolique maximal est faible ($PDM \approx -60$ à -70 mV), la dépolarisation diastolique en phase 4 est spontanée et lente, la phase de dépolarisation du PA est lente et l'amplitude du PA faible (Hoffman *et al.*, 1959 ; Schram *et al.*, 2002). Les cellules du nœud AV sont caractérisées par une faible vitesse de dépolarisation et de conduction. La vitesse de conduction dans le nœud AV est globalement très lente (0,1 m/s). Cette vitesse lente de conduction dans le nœud AV 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. 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 al.*, 2001).

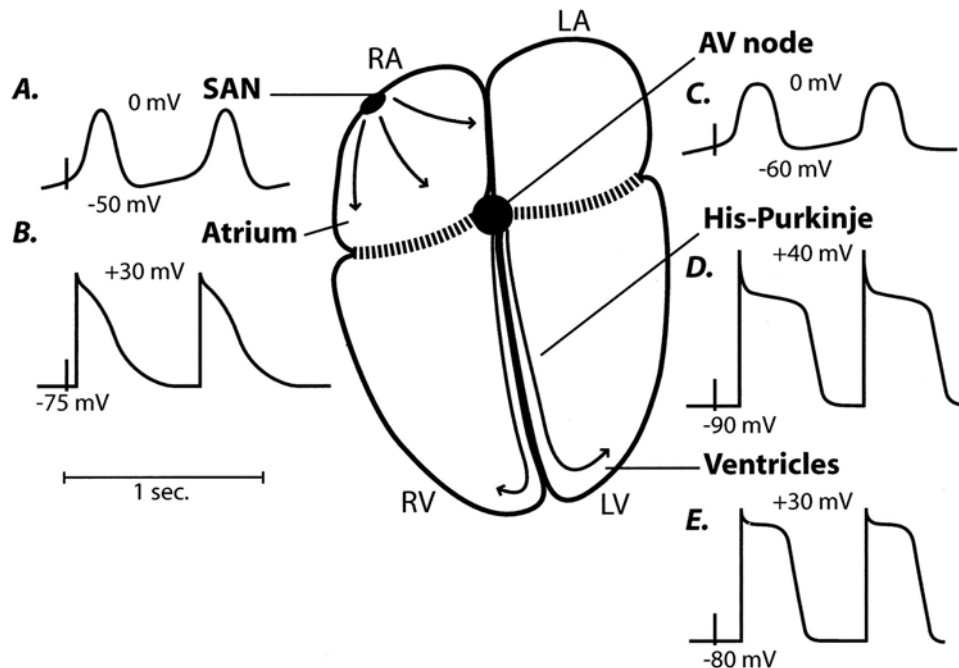


Figure 10 : Représentation schématique du cœur et des potentiels d'action correspondants aux différentes régions. AV node, nœud AV ; SAN, nœud sinusal ; LA, oreillette gauche ; RA, oreillette droite ; LV, ventricule gauche ; RV, ventricule droit. D'après Schram *et al.*, 2002.

Deux approches distinctes sont utilisées pour définir anatomiquement le nœud AV. Cette structure peut être considérée comme une partie de la jonction auriculo-ventriculaire et être divisée en trois régions différentes (Figure 11, page 27) : la zone transitionnelle, la portion compacte et la partie pénétrant à l'intérieur de la branche auriculo-ventriculaire (Hecht *et al.*, 1973). Dans sa partie distale, la portion compacte du nœud AV pénètre à l'intérieur du corps fibreux central qui devient ensuite le faisceau de His. La deuxième approche est plus étroitement corrélée à l'activité électrophysiologique des différents types cellulaires. En 1960, Paes de Carvalho et de Almeida ont séparé la région du nœud AV en trois zones identifiées à partir de leurs temps d'activation et leurs potentiels transmembranaires. Ils ont ainsi distingué la zone N (*nodal*) du nœud AV dite "compacte", la zone NH (*nodal-His*) localisée à la jonction entre la zone N et le faisceau de His et la zone AN (*atrionodal*) qui correspond à la jonction entre une zone de conduction rapide dans les oreillettes et une zone de conduction plus lente dans la zone N. La conduction la plus lente (temps de conduction de 0.03 m/s) survient dans la zone N. Dans les régions AN et NH, une activité de dépolarisation diastolique peut survenir ce qui n'est pas le cas au niveau de la région N.

Plus récemment, plusieurs types cellulaires ont été décrits dans le nœud AV : des cellules de transition qui correspondent à la zone AN, des cellules nodales typiques (Zone N), des cellules nodales basses et les cellules de la boucle atrioventriculaire (His) correspondant à la zone NH (Billette *et al.*, 1987 ; Meijler *et al.*, 1988). Les cellules de la zone N et NH sont ovoïdes (Figure 11), ont un potentiel diastolique maximal entre -65 et -55 mV, une vitesse de dépolarisation diastolique rapide, une vitesse de dépolarisation du PA plus lente, et ne raccourcissent pas leur PA quand la fréquence augmente (Munk *et al.*, 1996 ; Hancox *et al.*, 1997). Les cellules de la zone AN ont une forme de bâtonnet (*rod-shaped*), leur activité *pacemaker* spontanée est éliminée par l'influence des cellules atriales voisines, et la forme de leur PA est intermédiaire entre les cellules typiquement nodales et les cellules atriales. Les cellules de la zone N du nœud AV possèdent peu de connections avec les cellules environnantes, et la conduction y est lente. Comme dans la zone centrale du nœud sinusal, les connexines les plus exprimées sont les connexines 45 et 30.2. La conduction lente dans le nœud AV repose en partie sur l'expression de la Cx30.2, comme l'a démontré un modèle de souris dans lequel la perte de fonction du gène de la Cx30.2 accélère la conduction AV suprahissienne (Kreuzberg *et al.*, 2006). L'expression de la Cx43 est hétérogène dans le nœud AV. Elle est très faible dans la zone N et augmente dans les régions périphériques AN et NH. Dans la zone NH, on retrouve aussi la connexine 45 associée à la connexine 40 (Efimov *et al.*, 2004).

Une classification plus récente divise le nœud AV en 4 parties : le nœud AV "compact", les cellules transitoires, une extension nodale postérieure et un faisceau nodal inférieur (Medkour *et al.*, 1998).

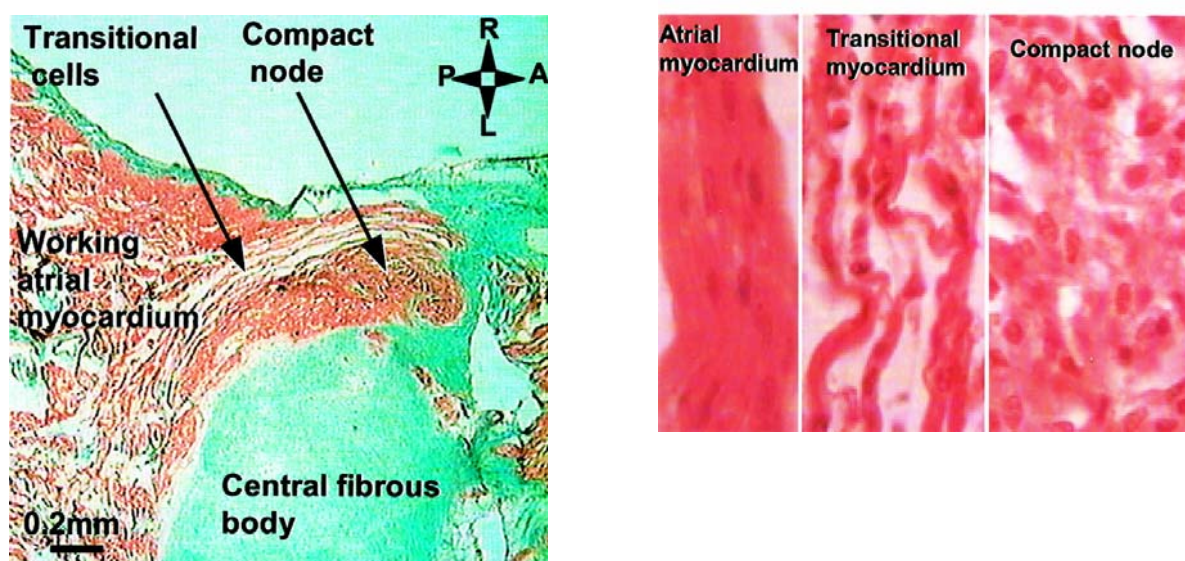


Figure 11 : Coupe histologique de la région du nœud AV. Localisation du myocarde atrial contractile, des cellules de transition et du nœud compact. A droite, différents types cellulaires à plus fort grossissement. D'après Mazgalev *et al.*, 2001.

Les cellules atriales par lesquelles arrive l'influx électrique se mêlent aux cellules de transition pour gagner le centre du nœud AV, en provenance de quatre directions différentes. Des fibres atriales arrivent du plancher du sinus coronaire, de la paroi antérieure de l'oreillette droite, de la partie gauche du septum interatrial et enfin du septum sinusal, bande musculieuse qui relie le sinus coronaire au foramen ovale (Kléber *et al.*, 2001). Deux voies principales d'activation du nœud AV sont connues, une voie d'activation postérieure lente et une voie antérieure rapide (Figure 12). La voie d'activation rapide passe devant l'orifice du sinus coronaire et possède une période réfractaire plus longue que la voie postérieure lente passant par la *crista terminalis*.

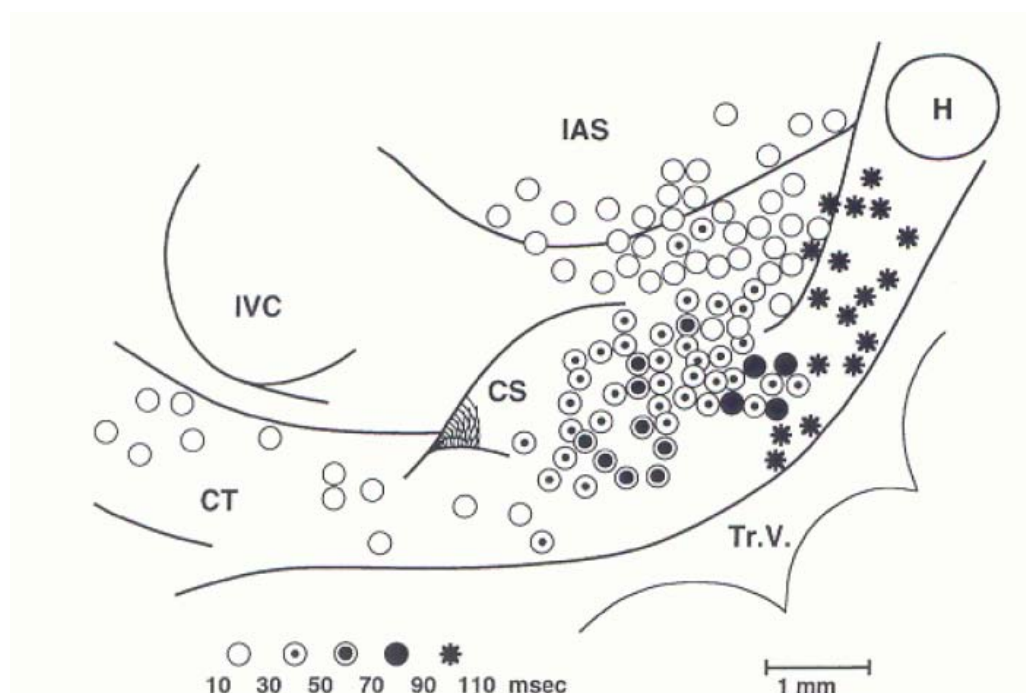


Figure 12 : **Activation du nœud auriculo-ventriculaire.** Carte représentant la séquence d'activation lors de conduction antérograde dans le nœud AV chez le lapin. Les symboles indiquent la position des cellules du nœud AV à partir desquelles ont été enregistrés les PA et leur vitesse d'activation par pas de 20 ms. CT, *crista terminalis* ; IAS, septum interatrial ; IVC, veine cave inférieure ; CS, ostium du sinus coronaire ; Tr V, valve tricuspide ; H, position de l'électrode extracellulaire sur la branche commune du faisceau de His. D'après Janse *et al.*, 1976.

Il n'existe pas de différences tissulaires entre les deux voies principales de conduction. Les propriétés de conduction rapide ou lente viendraient de l'architecture du triangle de Koch et des approches atriales multiples vers le nœud AV. L'existence de plusieurs couches cellulaires s'activant successivement et d'une hétérogénéité fonctionnelle

des cellules du nœud AV (cellules N, AN, NH) permettrait aussi d'expliquer la présence de voies de conduction aux propriétés de conduction différentes.

Comme le nœud sinusal, le nœud AV est richement innervé par des fibres sympathiques et parasympathiques, mais à l'inverse du nœud sinusal, les zones d'innervation par les différentes fibres sont bien différenciées (James, 1967). La stimulation par le parasympathique droit a moins d'effet sur le nœud AV que sur le nœud sinusal, et inversement la stimulation parasympathique gauche a plus d'effet sur le nœud AV que sur le nœud sinusal. Par ailleurs, il semblerait que la libération d'acétylcholine soit prédominante au niveau des cellules N (Imaizumi *et al.*, 1990). La stimulation cholinergique hyperpolarise le potentiel de membrane des cellules du nœud AV ralentissant la conduction.

La stimulation sympathique améliore la conduction dans le nœud AV par l'augmentation du courant calcique dans les cellules A et AN, accélérant la vitesse de dépolarisation et l'amplitude du PA, sans changer le potentiel diastolique maximal de ces cellules. De plus, la pente de dépolarisation diastolique est augmentée dans les cellules NH (Meijler & Janse, 1988).

b. Spécificité des courants ioniques du nœud auriculo-ventriculaire

Le courant *pacemaker* I_f est présent dans 95% des cellules ovoïdes contre 10% des cellules de la zone AN, et sa densité est 25 fois plus importante dans les cellules ovoïdes (Munk *et al.*, 1996). La densité du courant I_f dans les cellules du nœud AV est inférieure à celle du courant enregistré dans les cellules du nœud sinusal (Marger *et al.*, 2006). Les gènes codant les sous-unités des canaux HCN dans le nœud AV seraient HCN4 et HCN1 (Dobrzynski *et al.*, 2003 ; Marionneau *et al.*, 2005).

Alors qu'il est communément admis que la dépolarisation des cellules dans le nœud AV dépend majoritairement de l'entrée de calcium, une controverse subsiste sur la présence d'un courant sodique dans les cellules N. Il semblerait que dans les cellules du nœud AV, le potentiel d'action soit déclenché par la combinaison d'un courant sodique rapide et d'un courant calcique lent, et que plus on se rapproche de la zone N, plus la part du courant sodique diminue. La levée d'inactivation des canaux calciques est lente et peut dépasser la durée de repolarisation dans les cellules ayant un potentiel de repos bas. Ce phénomène pourrait participer à l'allongement du temps de conduction dans le nœud AV en fonction de la durée de cycle (Kléber *et al.*, 2001). En ce qui concerne les courants calciques, à la fois $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$ ont été enregistrés dans les cellules spontanément actives du nœud AV (Munk *et*

al., 1996 ; Liu *et al.*, 1993). L'allongement de l'intervalle PR chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ suggère par ailleurs la contribution de la sous-unité $Ca_v1.3$ dans la génération du courant $I_{Ca,L}$ dans le nœud AV (Zhang *et al.*, 2002). Le courant I_{Na} est présent dans quasiment toutes les cellules AN alors qu'il a été enregistré dans seulement environ 30% des cellules ovoïdes (N et NH) (Munk *et al.*, 1996). De manière concordante, l'expression du canal $Na_v1.5$ n'a été détectée que dans les cellules transitoires et les cellules du faisceau nodal inférieur (Petrecca *et al.*, 1997). Contrairement à son effet sur le rythme cardiaque, l'absence d'effet de la TTX (100 nM) sur la durée de l'intervalle PR suggère l'absence d'implication des canaux sodiques de type neuronal et squelettique dans la conduction de l'influx électrique par le nœud AV (Maier *et al.*, 2003). Les défauts de conduction auriculo-ventriculaire décrits à la fois chez des patients porteurs de mutations sur le gène *SCN5A* ($Na_v1.5$; Tan *et al.*, 2001) et chez la souris *Scn5a*^{+/-} (Papadatos *et al.*, 2002) attestent par ailleurs du rôle clef du canal $Na_v1.5$ dans la génération du courant I_{Na} dans le nœud AV. Le courant sodique I_{st} a également été observé dans les cellules du nœud AV (Mitsuiye *et al.*, 2000).

Alors que le courant I_{to} n'a été enregistré que dans environ 30% des cellules ovoïdes, il est présent dans quasiment toutes les cellules de la zone AN (Munk *et al.*, 1996 ; Mitcheson *et al.*, 1999). Le courant I_{Kr} , dont la désactivation est plus rapide que dans le ventricule, représente une composante majeure de l'activité automatique du nœud AV chez le lapin (Howarth *et al.*, 1996 ; Hancox *et al.*, 1997 ; Sato *et al.*, 2000). Ce courant a été récemment enregistré dans des cellules du nœud AV chez la souris (Marger *et al.*, 2006). Toutefois son rôle dans la conduction est incertain car les souris *ERG1B*^{-/-} ne présentent aucun défaut de conduction auriculo-ventriculaire (Lees-Miller *et al.*, 2003). La contribution des courants I_{Ks} et I_{K1} est faible (Hancox *et al.*, 1997 ; Sato *et al.*, 2000). Cependant, la densité du courant I_{K1} dans les cellules du nœud AV est supérieure à celle mesurée dans les cellules du nœud sinusal (Marger *et al.*, 2006). Cette différence pourrait permettre d'expliquer le rythme plus lent de dépolarisation des cellules du nœud AV par rapport à celles du nœud sinusal.

3. Du nœud auriculo-ventriculaire au 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 continue la direction du tronc commun, sous l'endocarde de la face droite du septum, puis dans le myocarde, puis à nouveau sous-endocardique, dans la bandelette ansiforme, jusqu'au pilier antérieur de la tricuspide où elle se termine en deux ou trois branches.

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 du faisceau de His est sujette à une importante variabilité (Figure 13). Le plus souvent, la branche gauche traverse le septum sous forme d'une large bande en dessous de la sigmoïde aortique. Elle se divise rapidement en un grand nombre de fibres très fines disposées en un faisceau postéro-inférieur et un faisceau antéro-supérieur, proche de la branche droite. Toutefois fréquemment, il n'existe pas de véritable division entre une branche antéro-supérieure et une branche postéro-inférieure de la branche gauche du faisceau de His. Lorsqu'une division entre ces deux hémibranches est présente, de nombreuses interconnexions entre ces hémibranches sont présentes (Massing & James, 1976).

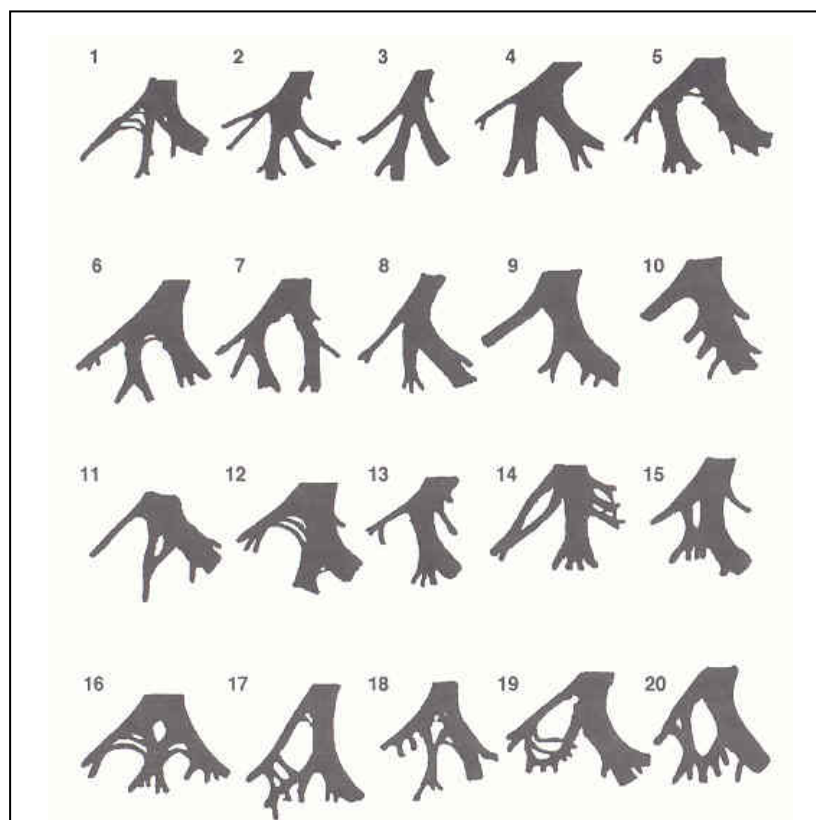


Figure 13 : **Division de la branche gauche du faisceau de His.** Illustration de la grande variabilité entre individus, 20 cœurs différents sont représentés. D'après Demoulin & Kulbertus, 1972.

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'arriver quasiment simultanément dans l'ensemble de l'endocarde des ventricules droit et gauche. Récemment, une asymétrie du système His-Purkinje a été mise en évidence chez la souris (Figure 14). Elle est similaire à celle observée chez les plus gros mammifères et l'homme (Miquerol *et al.*, 2004).

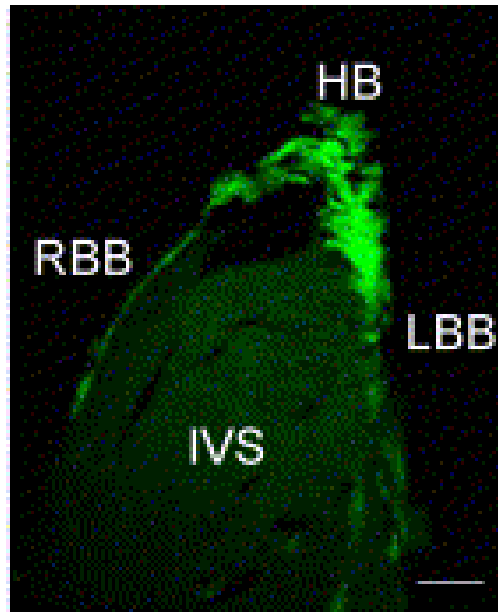


Figure 14 : **Asymétrie du système His-Purkinje chez la souris.** Le réseau His-Purkinje est marqué en vert par une protéine immunofluorescente exprimée sous le contrôle du promoteur de la connexine 40. RBB, branche droite du faisceau de His ; LBB, branche gauche du faisceau de His ; IVS, septum interventriculaire, HB, branche commune du faisceau de His. D'après Miquerol *et al.*, 2004.

Les fibres du faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje (FP) sont responsables de la propagation rapide de l'influx électrique du nœud AV vers les ventricules (Schram *et al.*, 2002). La vitesse rapide de conduction dans les fibres de Purkinje est de l'ordre de 2 m/s. Elle dépend majoritairement des canaux sodiques. A ce niveau contrairement à ce qui est observé dans le nœud AV, la conduction n'est pas décélérentielle mais répond à la loi du tout ou rien. Cependant, lorsque les fibres sont lésées, elles acquièrent les propriétés de fibres lentes en devenant dépendantes des canaux calciques.

Le faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje constituent des foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement en cas de bloc auriculo-

ventriculaire. Elles servent alors de foyers d'automatisme secondaire comme peuvent l'être les cellules du nœud AV à l'exception des cellules de la zone N.

Le potentiel membranaire des FP est plus négatif que celui des ventricules de 5 à 10 mV. Chez la souris, il est autour de -80mV . Les FP ont une phase de dépolarisation du PA rapide. La phase 1 de repolarisation est rapide et prononcée, mais un plateau proéminent peut avoir lieu à des potentiels négatifs. La durée du PA est plus longue par rapport au ventricule, et présente une dépolarisation diastolique en phase 4 (Anumonwo *et al.*, 2001 ; Miquerol *et al.*, 2004 ; Figure 15). Dans certaines cellules, la phase 1 de repolarisation est suivie par une dépolarisation transitoire responsable de la configuration *spike and dome* caractéristique du PA des cardiomyocytes ventriculaires sous-épicaux chez les grands mammifères. La durée du PA dans les FP du ventricule droit est plus longue que dans celles du ventricule gauche (Figure 15).



Figure 15 : Potentiels d'action enregistrés dans les cellules des fibres de Purkinje et de la paroi libre du ventricule chez la souris adulte VW, paroi libre du ventricule ; RBB, branche droite du faisceau de His ; LBB, branche gauche du faisceau de His. D'après Miquerol *et al.*, 2004.

Les fibres du faisceau de His et les FP sont par ailleurs caractérisées par la survenue de post-dépolarisations précoces (ou *EAD*, *early after depolarizations*) au cours de rythmes lents, alors que celles-ci n'ont jamais été enregistrées dans le myocarde chez la souris saine. Chez l'homme, ces *EAD* sont responsables de réentrées dans le tissu endocardique adjacent, conduisant notamment aux troubles du rythme ventriculaire associés aux syndromes du QT Long. Ces anomalies électriques pourraient s'expliquer par la durée plus longue du PA ainsi que par le potentiel négatif auquel a lieu le plateau dans ces fibres.

A ce jour, seul le courant I_f a été enregistré à partir de cellules issues de FP chez la souris. Dans cette espèce, aucune donnée d'expression des sous-unités des canaux ioniques dans les FP n'existe, du fait de la difficulté d'isolement de ces fibres. L'enregistrement du courant I_f chez l'homme et la souris est en accord avec l'activité automatique des FP (Han *et al.*, 2001 ; Miquerol *et al.*, 2004). Chez le lapin, l'expression protéique des canaux HCN dans les FP est plus faible que dans le nœud sinusal, mais plus forte que dans le ventricule (Shi *et al.*, 1999). En ce qui concerne les canaux Na^+ , un courant I_{Na} , TTX-sensible, à inactivation lente, pourrait être impliqué dans le maintien du PA de longue durée, particulièrement au cours de rythmes lents (Carmeliet, 1987). L'allongement de l'intervalle PR et du complexe QRS chez les souris $\text{SCN5A}^{+/-}$ pourrait par ailleurs s'expliquer par un défaut de conduction dans le faisceau de His et ses branches ou dans les FP (Papadatos *et al.*, 2002). Chez le chien, les FP présentent à la fois les courants Ca^{2+} $I_{\text{Ca,L}}$ et $I_{\text{Ca,T}}$ (Hirano *et al.*, 1989). La faible expression des transcrits de $\text{Ca}_v1.2$ et la faible densité du courant $I_{\text{Ca,L}}$ pourraient expliquer le potentiel moins positif du plateau dans les FP. Par contre, l'expression des transcrits de $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ et $\text{Ca}_v3.3$, ainsi que la densité du courant $I_{\text{Ca,T}}$, sont plus importantes dans les FP par rapport au ventricule (Tseng *et al.*, 1989). L'absence d'effet de l'inhibition du courant $I_{\text{Ca,T}}$ par le mibéfradil sur l'automatisme des FP chez le chien suggère qu'il ne contribue pas à l'activité automatique des FP, mais plutôt à la genèse du PA et en particulier à son plateau (Pinto *et al.*, 1999).

Chez le chien, le courant I_{to} des FP présente des caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques différentes du courant I_{to} ventriculaire : il est TEA-sensible, sa sensibilité à la 4-AP est plus forte, et sa levée d'inactivation est lente (Han *et al.*, 2000). La composante 4-AP sensible d' I_{to} dans ce tissu semble être générée par la sous-unité $\text{K}_v4.3$ qui présente une expression similaire dans les FP et le ventricule, alors que $\text{K}_v4.2$ et $\text{K}_v1.4$ présentent une expression faible (Han *et al.*, 2000, 2002). La très faible expression de la sous-unité régulatrice KChIP2 dans les FP par rapport au ventricule pourrait par ailleurs expliquer le ralentissement de la cinétique de levée d'inactivation du courant I_{to} . La forte expression de la sous-unité $\text{K}_v3.4$, TEA-sensible, dans les FP par rapport au ventricule pourrait quant-à-elle constituer la composante TEA-sensible d' I_{to} . Chez le chien, les courants I_{Kr} et I_{Ks} sont similaires à ceux enregistrés dans les cellules ventriculaires et atriales. La contribution du courant I_{Ks} dans la repolarisation est importante sous stimulation β -adrénergique alors qu'elle est faible à l'état basal (Han *et al.*, 2001). L'expression des transcrits et des protéines ERG1 et KCNQ1 est plus faible dans les FP par rapport aux ventricules (Han *et al.*, 2002). L'expression plus faible de ces trois protéines dans les FP pourrait être à l'origine de la durée plus longue du PA. La détection plus importante de la protéine MIRP1 (minK related peptide 1) dans les FP par rapport au ventricule suggère par ailleurs son implication dans la régulation des courants I_{K} ou I_f (Pourrier *et al.*, 2003). Enfin, deux études ont montré de

faibles courants I_{K1} dans les FP par rapport au ventricule chez le lapin et le mouton, tandis qu'une autre réalisée chez l'homme, a révélé des niveaux équivalents (pour revue, Schram *et al.*, 2002).

Les myocytes du système de conduction ventriculaire diffèrent aussi des cellules contractiles du myocarde ventriculaire par une expression différente des connexines. Les cellules de conduction expriment les connexines 40, 43 et 45 tandis que les myocytes contractiles du ventricule n'expriment que la Cx43. Les différents étages du faisceau de His et ses branches présentent une expression variable des connexines. Les Cx40 et Cx45 sont exprimées dans la partie proximale de la branche commune tandis que les Cx40, Cx43 et Cx45 sont retrouvées dans sa partie distale. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux observés chez l'homme, car la Cx43 est retrouvée dans la partie proximale (van Veen *et al.*, 2005). Chez la souris, la vitesse de conduction est plus rapide dans la partie proximale des branches du faisceau de His par rapport à celle mesurée plus distalement au niveau du milieu du septum interventriculaire. Cette réduction de la vitesse de conduction viendrait de l'augmentation du nombre de fibres plus les branches progressent vers l'apex des ventricules. Les fibres de Purkinje expriment trois connexines, les Cx40, Cx43 et Cx45 (van Veen *et al.*, 2001).

II. MODÈLES MURINS DE DYSFONCTION SINUSALE ET/OU DE TROUBLES DE LA CONDUCTION AURICULO-VENTRICULAIRE

A. Rappels de physiologie cardiaque chez la souris

Grâce aux possibilités offertes par la transgénèse, de nombreux modèles de souris modifiées génétiquement sont apparus ces dix dernières années. Le séquençage complet du génome murin en 2002 (Waterston *et al.*, 2002) qui a montré que celui-ci avait 80 % d'homologie avec le génome humain a par ailleurs permis d'élargir encore ces possibilités. Parmi les souris transgéniques générées, certaines ont permis de préciser le rôle physiologique de protéines dont des canaux ioniques essentiels à l'automatisme et à la conduction de l'influx électrique cardiaque. Grâce à l'expression de mutations délétères connues chez l'homme ou l'invalidation de gènes clés dans l'automatisme des cellules *pacemaker*, certaines souris transgéniques miment par exemple le phénotype observé lors d'une dysfonction sinusale chez l'homme. Ces animaux permettent de préciser les

mécanismes physiopathologiques à l'origine de ce dysfonctionnement et peuvent servir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les maladies cardiovasculaires constituent des pathologies multifactorielles complexes qui sont difficiles à étudier chez l'homme, car l'hétérogénéité génétique et les interactions géniques ou gènes-environnement réduisent considérablement la puissance statistique. Les modèles murins sont donc d'un grand intérêt, non seulement parce que l'on peut obtenir de grands échantillons rapidement, mais aussi parce que des études physiologiques complètes peuvent être réalisées sur des populations génétiquement uniformes dont les fonds génétiques sont bien caractérisés. Par ailleurs, ces modèles peuvent être intéressants pour approfondir notre connaissance de la pathogenèse des affections cardiovasculaires d'origine génétique car il est difficile d'avoir accès aux tissus cardiaques de patients.

Toutefois, de nombreuses souris transgéniques ont pu s'avérer décevantes en tant que modèle animal car elles ne présentaient pas le phénotype attendu caractéristique d'une pathologie humaine. Il faut donc considérer avec intérêt les différences physiologiques entre l'homme et la souris qui peuvent en partie expliquer ces écarts.

Le cœur d'une souris adulte pèse de 120 à 180 mg selon la lignée utilisée, pour un ratio "poids du cœur/poids du corps" de 5 à 6 mg/g. Le diamètre du ventricule gauche est d'environ 2 mm, l'épaisseur du septum interventriculaire de 1,3 mm et la paroi du ventricule gauche de 1,5 mm. Son volume d'éjection est compris entre 25 et 40 μ l, ce qui rapporté au poids de l'animal correspond aux valeurs connues chez l'homme et les plus gros animaux. Le volume sanguin total de la souris est de 2,3 ml (soit 80 ml/kg *versus* 60-70 ml/kg chez l'homme). Du fait de sa petite taille et de sa densité mitochondriale plus importante, le cœur de souris requiert un apport énergétique supérieur par unité de temps et de masse que les plus grands animaux (Doevendans *et al.*, 1998).

La chaîne de la myosine prédominante dans le cœur de la souris est celle de type α , qui présente une meilleure activité ATPase que la chaîne β , majoritaire chez l'homme. Les cardiomyocytes représentent environ 90% du volume tissulaire du ventricule gauche chez la souris FVB. Même si en volume les cardiomyocytes sont majoritaires, les autres types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales sont plus importants en nombre dans le tissu ventriculaire (85% de toutes les cellules). Par contre dans les oreillettes, les cardiomyocytes représentent 69% du nombre total de cellules (Doevendans *et al.*, 1998).

Le cœur de la souris diffère morphologiquement du cœur humain : (i) la veine cave supérieure gauche persiste et se jette dans l'oreillette droite, (ii) il n'y a pas de septum atrial secondaire, (iii) le nœud sinusal est localisé dans la veine cave supérieure au-dessus de sa jonction avec l'oreillette droite au lieu d'être dans l'oreillette elle-même (Doevendans *et al.*, 1998). Structurellement, le système de conduction (nœud sinusal, nœud AV, faisceau de His et réseau de Purkinje) est semblable à celui de l'homme (Rentschler *et al.* 2001), bien qu'il existerait des connexions directes entre le faisceau de His et le septum ventriculaire (van Rijen *et al.*, 2001).

La fréquence cardiaque moyenne chez une souris vigile est d'environ 600 battements par minute, soit 10 fois plus rapide que chez l'homme. Des différences entre lignées de souris consanguines ont été rapportées. Par exemple la fréquence cardiaque moyenne des souris FVB est supérieure à celle des souris C57BL6/129Sv (680 contre 609 bpm). Cette différence a été attribuée à un tonus sympathique basal plus fort chez les FVB (Shusterman *et al.*, 2002). Sous anesthésie, la fréquence cardiaque est plus lente, autour de 450 battements par minute mais peut descendre encore plus bas selon les anesthésiques utilisés. Les différences entre lignées consanguines sont à prendre en compte dans le choix du fond génétique sur lequel la souris transgénique sera réalisée. En effet, les spécificités physiologiques ou morphologiques de chacune des lignées peuvent favoriser ou au contraire masquer le phénotype attendu après invalidation du gène d'intérêt. Le laboratoire Jackson aux Etats-Unis a récemment créé en collaboration avec des institutions académiques et des industriels une banque de données, accessible à tous sur son site internet, regroupant les caractéristiques phénotypiques propres à chaque lignée de souris de laboratoire (Mouse Phenome Database, <http://www.jax.org/phenome>).

De manière similaire à ce qui est observé chez les sportifs, l'entraînement physique chez la souris induit une bradycardie au repos par rapport à des souris non entraînées. Ces modifications sont dues à une augmentation du tonus vagal et à une diminution du tonus sympathique (De Angelis *et al.*, 2004).

Les différences mâle-femelle sont aussi à prendre en compte lors de l'étude d'un modèle de souris. Il a été montré chez la souris que les œstrogènes modifient le tonus du système nerveux autonome sur le nœud sinusal et le nœud AV. Chez la souris femelle ovariectomisée, la fréquence cardiaque est plus lente (485 versus 587 bpm) et les effets du blocage du système nerveux autonome sur la période réfractaire du nœud AV et le point de Wenckebach sont moindres par rapport aux femelles intactes (Saba *et al.*, 2004). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la survenue préférentielle de troubles du rythme chez l'homme et chez la femme ménopausée.

La séquence de dépolarisation et repolarisation cardiaque chez la souris est légèrement différente de celle de l'homme (Figure 16). Par ailleurs, chez la souris, l'activation du septum interventriculaire se fait de la base vers l'apex et non de l'apex vers la base comme chez les plus gros mammifères (van Rijen *et al.*, 2001) grâce à des connexions directes entre les branches du faisceau de His et la base du septum. L'aspect de son ECG de surface est différent de celui de l'homme, car l'onde de repolarisation est accolée au complexe QRS (Figure 16). Celle-ci a une apparence biphasique constituée d'une phase rapide positive correspondant au début de la repolarisation (appelée J dans la littérature) et d'une phase lente négative correspondant à l'onde T (Liu *et al.*, 2004). Cette onde T négative suggère une repolarisation tardive murine différente de celle qui est observée chez l'homme.

Chez la souris vigile, aucune différence mâle-femelle n'est observée dans la repolarisation ventriculaire. Par contre, lors d'enregistrements sous anesthésie au pentobarbital, les femelles présentent un QT_c plus long que les mâles (Brouillette *et al.*, 2003 ; Brunet *et al.*, 2004). Le sexe n'aurait aucun impact sur l'expression et la fonction des canaux potassiques K_v dans plusieurs souches consanguines à fond génétique stable (inbred) telles que les C57BL6, FVB ou 129Sv. Par contre, la différence serait plus marquée lors de l'utilisation de souches non-consanguines (outbred) comme les CD-1 (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001 ; Brouillette *et al.*, 2003 ; Brunet *et al.*, 2004).

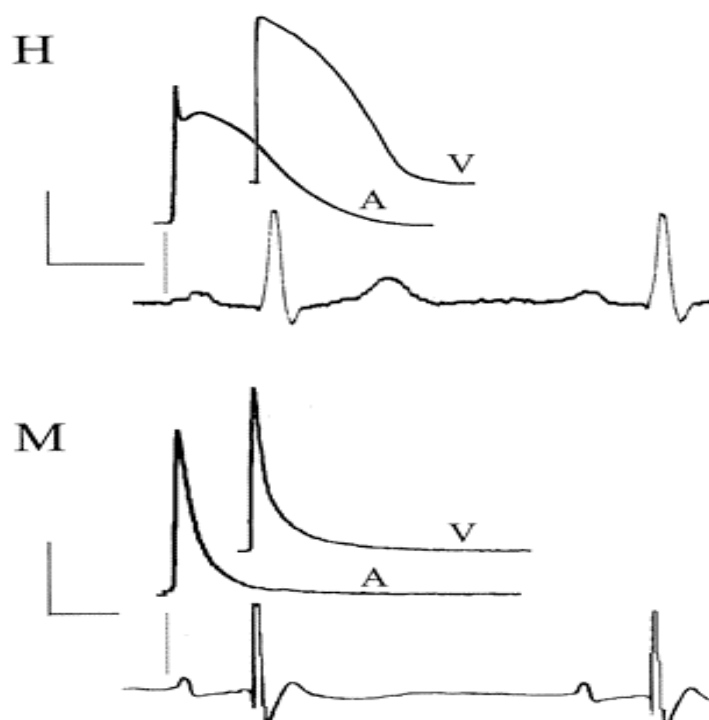


Figure 16 : Comparaison des potentiels d'action ventriculaires et auriculaires humains (H) et murins (M), et électrocardiogrammes correspondants. D'après Nerbonne *et al.*, 2001.

Il existe des différences très marquées entre les PA ventriculaires humains et murins suggérant une expression et un rôle fonctionnel des canaux ioniques différents (Figures 16 et 17). Chez la souris adulte, la phase de dépolarisation rapide (phase 0) est similaire à celle de l'homme. La distinction se fait essentiellement au niveau de la repolarisation. Chez l'homme, la phase de dépolarisation est suivie d'une première phase de repolarisation rapide (phase 1) puis d'une phase plateau lente (phase 2) et enfin de la phase de repolarisation terminale rapide (phase 3) qui assure un retour au potentiel de repos. Chez la souris adulte, il n'y a pas de phase de plateau, et la repolarisation est rapide. Les courants cardiaques repolarisants principaux identifiés dans les cardiomyocytes ventriculaires sont I_{to} ($I_{to,f}$, $I_{to,s}$), $I_{K,slow}$ ($I_{K,slow1}$, $I_{K,slow2}$) et I_{ss} (Xu *et al.*, 1999). Bien que les courants repolarisants I_{Ks} et I_{Kr} aient un rôle prépondérant durant la repolarisation ventriculaire embryonnaire (Wang *et al.*, 1996), ils ne sont pas (ou très peu) détectables dans les cardiomyocytes des souris adultes, contrairement à ce qui est observé chez l'homme (Nerbonne *et al.*, 2001). Des différences d'expression régionale ont aussi été mises en évidence chez la souris pour les courants $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$ (Xu *et al.*, 1999 ; Brunet *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2004). La densité du courant $I_{to,f}$ est plus forte dans le ventricule droit par rapport au ventricule gauche (Brunet *et al.*, 2004), et à l'apex par rapport au septum (Xu *et al.*, 1999). Le courant $I_{to,s}$ n'est détecté que dans le septum. Ces différences de courants se traduisent par des PA intra-ventriculaires différents et contribuent donc à l'hétérogénéité de la repolarisation chez la souris.

Il est important de noter que les différences majeures entre l'homme et la souris dans le tissu ventriculaire concernent principalement les courants K^+ repolarisants. Dans le nœud sinusal, ces différences sont moins marquées car, entre autres, le courant I_{Kr} est présent. Par conséquent, lorsque des modèles de souris transgéniques invalidées pour des canaux dépolarisants sont générés, ils reproduisent souvent assez fidèlement les anomalies mises en évidence chez l'homme lors de mutations touchant les gènes codants pour ces mêmes canaux, contrairement aux souris invalidées pour des sous-unités des canaux potassiques.

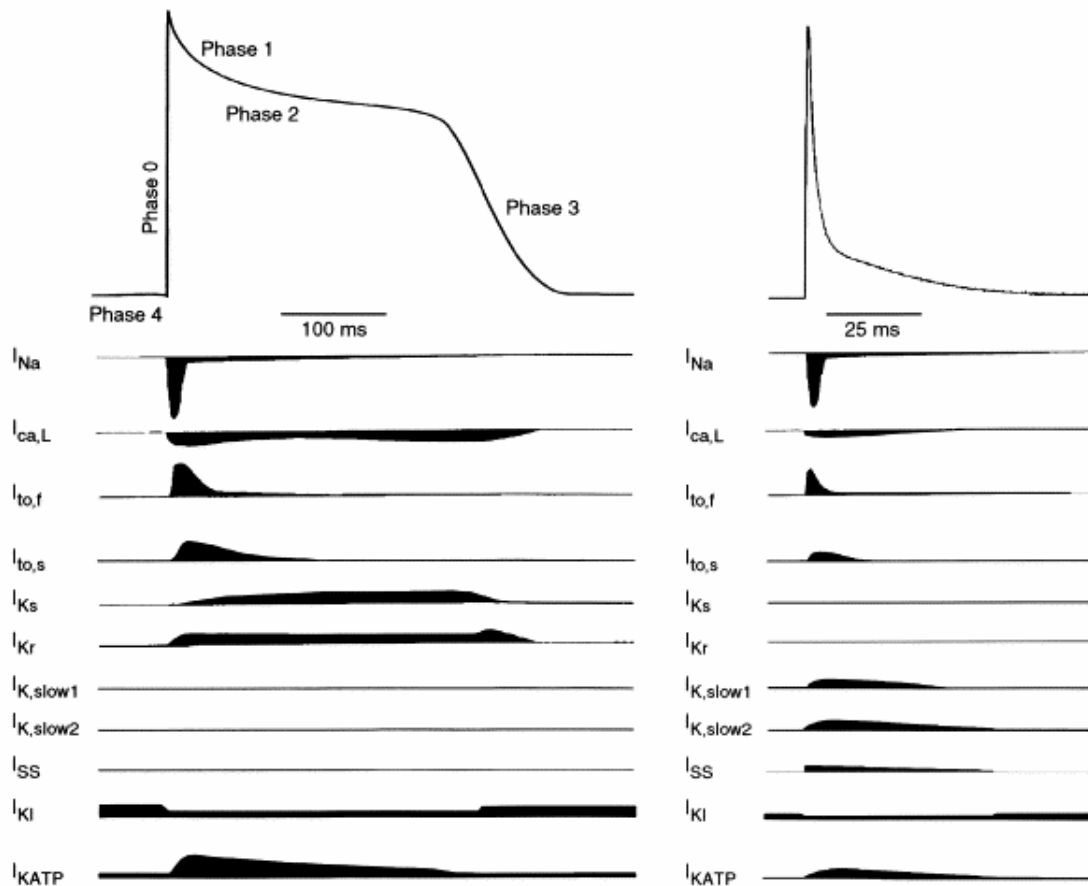


Figure 17 : Représentation schématique des courants ioniques et des potentiels d'action ventriculaires résultant de leur activation chez l'homme (à gauche) et la souris (à droite). D'après Nerbonne *et al.*, 2001.

B. Dysfonction sinusale et modèles murins

Bien que conservant la commande de l'ensemble de la contractilité cardiaque, l'activité du nœud sinusal peut être anormale par sa fréquence trop élevée ou au contraire trop lente, ou par son irrégularité. Lorsqu'une bradycardie et/ou des pauses sinusales sont observées, on parle de dysfonction sinusale (Stieber *et al.* 2004). Dans d'autres cas, le nœud sinusal peut cesser son activité (arrêt sinusal) et c'est alors un autre centre de commande (*pacemaker* secondaire) qui prend le relais de l'automatisme sinusal. Parmi les centres de commandes extrasinusaux, il faut distinguer les centres supraventriculaires (myocarde auriculaire, nœud d'Aschoff-Tawara, tronc commun du faisceau de His) qui ne modifient pas la séquence normale d'activation de la masse ventriculaire, donnant un aspect électrique normal, non élargi, du ventriculogramme QRS et les centres ventriculaires. Ces

derniers siègent au-dessous de la bifurcation du faisceau de His, soit sur une des deux branches, soit dans le réseau de Purkinje ou encore dans le myocarde ventriculaire commun. Ils entraînent toujours un mode d'activation anormal de la masse ventriculaire avec retard d'un ventricule par rapport à l'autre, se traduisant à l'ECG par un élargissement du complexe QRS.

1. Dysfonction sinusale ou "sick sinus syndrome"

Le rythme cardiaque peut s'accélérer en conditions de stress ou lors de fièvre ou au contraire être ralenti en période de sommeil ou chez des athlètes entraînés. Ces adaptations sont physiologiques et ne constituent en rien des signes de dysfonctionnement du nœud sinusal.

Chez l'homme, les dysfonctions sinusales ou "sick sinus syndrome" (SSS) en anglais peuvent prendre différentes formes :

- rythme cardiaque trop lent ne permettant plus de couvrir les besoins vitaux, avec possible non adaptation à l'exercice ;
- rythme cardiaque trop rapide même au repos ;
- alternance de rythmes lent et rapide (Syndrome de bradycardie-tachycardie) ;
- pauses soudaines de l'activité sinusale (pause ou arrêt sinusal) durant plus de 2 à 3 s.

Les patients à risque de développer ce type de dysfonction sont également très divers. Tout d'abord les personnes âgées de plus de 65 ans peuvent souffrir de ces anomalies, car avec l'âge le nombre des cellules *pacemaker* diminue, leur fragilité augmente et du tissu fibreux peut s'installer en remplacement. Les patients ayant eu un infarctus du myocarde ou ayant subi une chirurgie cardiaque correctrice due à une malformation peuvent aussi présenter ce type de dysfonction. La prise de médicaments (par exemple : β -bloquants, antagonistes calciques, digitaliques, amiodarone) peut elle aussi modifier les propriétés du nœud sinusal. Enfin des désordres électrolytiques (hyperkaliémie) ou hormonaux (hypothyroïdie) peuvent aussi être mis en cause. Il est plus rare d'observer chez des patients une dysfonction sinusale idiopathique seule. Quelques cas familiaux héréditaires ont cependant été observés suggérant une origine génétique à cette dysfonction (Benson *et al.*, 2003). À ce jour, deux gènes (*SCN5A* et *HCN4*) ont été identifiés par l'approche gène candidat dans des familles et chez des propositus atteints de dysfonction sinusale (Benson *et al.*, 2003 ; Schulze-Bahr *et al.*, 2003 ; Milanesi *et al.*, 2006).

Selon les auteurs, les dysfonctions sinusales liées à des anomalies de la régulation de l'automatisme cardiaque par le système nerveux autonome peuvent ou non faire partie des anomalies de la commande sinusale. Une dérégulation du système nerveux autonome peut survenir dans un grand nombre de situations. Une atteinte de l'axe baroréflexe secondaire à une chirurgie, une tumeur ou un syndrome neuropathique d'origine génétique peuvent par exemple entraîner tachycardie, bradycardie ou irrégularité du rythme cardiaque (Ketch *et al.*, 2002).

Les symptômes cliniques d'une dysfonction sinusale sont très variés : fatigue, faiblesse, palpitations, étourdissement, syncope, confusion mentale ou douleur thoracique (Gregoratos *et al.*, 2003). Aucun traitement médical n'existant pour cette maladie, la dysfonction sinusale constitue une cause fréquente d'implantation de stimulateurs cardiaques électroniques.

2. Modèles murins de dysfonction sinusale

a. Dysfonction sinusale liée au vieillissement

Chez l'homme la fréquence cardiaque diminue de 10% entre 20 et 80 ans. Cette diminution est à mettre en relation avec une augmentation de tissus fibreux et élastiques dans le système de conduction. Par ailleurs des cellules graisseuses s'accumulant autour du nœud sinusal peuvent le séparer des cellules atriales, augmentant le temps de conduction sinoatrial et favorisent la survenue de blocs de sortie. Enfin avec l'âge, le nombre des cellules *pacemaker* se réduit : vers 75 ans il ne resterait plus que 10 % des cellules *pacemaker* présentes chez un jeune adulte (Lakatta & Sollott, 2002). Chez la souris âgée (48 semaines), la fréquence cardiaque est plus lente que chez des animaux plus jeunes (8 semaines). De manière similaire, les temps de conduction auriculo-ventriculaire (intervalle PR) et intraventriculaire (complexe QRS) sont plus longs chez les animaux âgés (Chaves *et al.*, 2003)

Le gène *klotho* agit comme un gène suppresseur du vieillissement qui prolonge la durée de vie lors de sa surexpression et induit un vieillissement accéléré lors de son invalidation. Les souris *kl/kl*, déficientes pour le gène *klotho* ont un vieillissement prématuré avec des signes d'artériosclérose, d'ostéoporose et des calcifications ectopiques dans plusieurs organes y compris le cœur (Kuro-o *et al.*, 1997). L'exploration du phénotype cardiaque de ces souris a révélé une fréquence cardiaque intrinsèque plus lente, un effet chronotrope positif de l'isoprénaline plus faible, et un effet chronotrope négatif de

l'acétycholine plus fort par rapport aux souris sauvages. En conditions de stress et lors du blocage du système nerveux autonome (SNA), ces souris sont fortement bradycardes avec des épisodes d'arrêt sinusal et de bloc de conduction sinoatriale. L'expression du gène *klotho* a été mise en évidence dans le nœud sinusal chez la souris mais les mécanismes responsables de la dysfonction sinusale observée chez les souris déficientes restent à élucider (Takeshita *et al.*, 2004). Comme le gène *klotho* code pour une protéine transmembranaire, il est possible que cette dernière soit essentielle à la fonction normale des canaux ioniques responsables de l'activité *pacemaker*.

b. Dysfonction sinusale associée à une cardiopathie

Chez l'homme, les dysfonctions sinusales peuvent être associées à des cardiopathies, qu'elles soient congénitales ou acquises. Lors d'infarctus du myocarde avec obstruction de l'artère coronaire droite, une dysfonction sinusale peut apparaître, ce cas de figure demeurant toutefois rare (Brady *et al.*, 2001). Lors du traitement chirurgical d'anomalies cardiaques congénitales (par exemple d'une communication inter-atriale ou d'une dysplasie valvulaire), la survenue d'une dysfonction sinusale peut faire partie des complications rencontrées. Enfin, chez les patients atteints de cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées, des troubles de la commande sinusale et/ou de la conduction auriculo-ventriculaire peuvent survenir. A travers des exemples tirés de la littérature, nous allons illustrer cette association entre cardiopathie et dysfonction sinusale dans des modèles de souris. Il est important de noter toutefois que lors de cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées chez la souris, des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire sont aussi très souvent associés.

L'introduction d'une mutation dans le gène codant pour la chaîne lourde α de la myosine (α -MHC) chez la souris entraîne une cardiomyopathie hypertrophique identique à celle identifiée dans des familles de patients porteurs d'une mutation similaire. Cette cardiomyopathie est associée à une dysfonction sinusale avec ralentissement de la fréquence cardiaque et allongement du temps de récupération sinusale lors d'exploration endocavitaire (Berul *et al.*, 1997). La désorganisation cellulaire et la fibrose consécutives à l'hypertrophie pourraient expliquer cette dysfonction.

Un modèle murin de la myopathie de Duchenne a été créé par délétion du gène de la dystrophine, protéine de l'appareil contractile des myocytes. Les souris déficientes en dystrophine (souris *mdx*) développent une cardiomyopathie dilatée hypertrophique avec

altération de la fonction contractile. Ces souris sont bradycardes à partir de l'âge de 42 semaines (Quinlan *et al.*, 2004). Par ailleurs, en présence d'isoprénaline, la réponse chronotrope négative à l'acétylcholine des oreillettes des souris mdx est supérieure à celle observée chez les souris sauvages. La bradycardie observée chez les souris mdx pourrait donc être due à une altération des interactions entre récepteurs muscariniques et adrénergiques, ou à une régulation croisée entre ces récepteurs (Lu *et al.*, 2000).

Dans l'insuffisance cardiaque congestive, une augmentation sérique et tissulaire (dans le cœur) des cytokines inflammatoires existe chez les patients. Un laboratoire a donc eu l'idée de créer une souris transgénique surexprimant le TNF- α (tumor-necrosis factor α) dans le cœur. Ces souris développent une cardiomyopathie avec tous les signes d'une insuffisance cardiaque congestive décompensée (effusions pleurales, congestion hépatique, dilatation atriale et ventriculaire). Dans ce modèle, les animaux transgéniques ont une fréquence cardiaque sinusale ralentie. De plus, la conduction auriculo-ventriculaire est allongée due à une atteinte infrahissienne. Enfin, les remaniements tissulaires du myocarde favorisent la survenue de troubles du rythme auriculaire du type flutter et fibrillation auriculaire (Saba *et al.*, 2005).

Lors d'hémochromatose d'origine génétique ou d'hémosidérose d'origine toxique, l'accumulation de fer se fait majoritairement dans le cerveau, le cœur, le foie et les tissus endocriniens. L'accumulation dans le cœur, favorisée par le passage à travers les canaux calciques de type L, entraîne une cardiomyopathie dilatée avec dysfonction diastolique et des arythmies. Chez la souris, lors d'une intoxication au fer, la cardiomyopathie avec une dysfonction diastolique est retrouvée, associée à une hypotension et une bradycardie. Une fibrose myocardique a été mise en évidence par l'analyse histologique. Dans ce modèle, l'administration d'inhibiteurs des canaux calciques (amlodipine et verapamil) a permis de prévenir ce phénotype cardiaque délétère (Oudit *et al.*, 2006).

c. Dysfonction sinusale idiopathique

◆ Avec perte de fonction des canaux HCN

Récemment, des mutations du gène *HCN4* ont été identifiées chez plusieurs propositus atteints de dysfonction sinusale idiopathique. La mutation *HCN4-573X* (Schulze-Bahr *et al.*, 2003) qui produit une protéine tronquée sans domaine de liaison à l'AMPc a été décrite chez un patient atteint de dysfonction sinusale et d'incompétence chronotropique. Dans un système de réexpression hétérologue, cette mutation restitue un canal fonctionnel générant un courant I_f avec une cinétique de désactivation plus rapide et incapable de

s'adapter à une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc lors de stimulation β -adrénergique. De plus, la protéine mutée a un effet dominant négatif sur la protéine sauvage.

Une seconde mutation (*HCN4-D553N*) a été découverte chez un propositus féminin atteint de bradycardie sévère, présentant des syncopes, des épisodes de tachycardie ventriculaire polymorphe et un QT long (Ueda *et al.*, 2004). Cette mutation est localisée dans le segment entre le domaine transmembranaire de la protéine et son domaine de liaison à l'AMPc. La mutation induit une diminution du courant I_f . La distribution du canal muté associé à la protéine de fluorescence verte dans des cellules COS7 montre une rétention intracellulaire du canal muté qui ne migre pas à la membrane comme la protéine sauvage (Ueda *et al.*, 2004).

Aucune donnée ne permet à ce jour de lier de manière causale certaines de ces mutations modifiant les propriétés fonctionnelles du canal HCN4 à la dysfonction sinusale observée chez les patients. Par contre, très récemment une forme familiale de bradycardie sinusale a été identifiée et a pu être reliée à l'existence, chez les patients atteints, d'une mutation du gène *HCN4* entraînant un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs, conduisant à une diminution du courant dans la gamme de potentiels correspondant à la dépolarisation diastolique. Cette mutation mime les effets d'une stimulation vagale sur les propriétés des canaux HCN (Milanesi *et al.*, 2006).

Chez l'homme, ces différentes mutations du gène *HCN4* sont observées à l'état hétérozygote.

Des modèles de souris invalidées pour les gènes HCN existent. Ils ont permis de confirmer le rôle essentiel de ces canaux dans l'activité *pacemaker* du nœud sinusal et d'évaluer les mécanismes physiopathologiques potentiels des dysfonctions sinusales observées chez les patients porteurs de mutations du gène HCN4.

Une souris transgénique invalidée pour le gène *HCN4* a été réalisée par délétion de l'exon 4 de ce gène (Stieber *et al.*, 2003). Les souris *HCN4*^{-/-} meurent au stade embryonnaire entre le 9.5^e et 11.5^e jours post-coïtum. Les souris hétérozygotes sont viables et indistinguables des souris contrôles sauvages (Wild type, WT).

Un second modèle de souris invalidant le gène *HCN4* exclusivement dans le cœur (*MLC2a-CRE* et *loxP-HCN4*) a été réalisé par recombinaison homologue conditionnelle (Stieber *et al.*, 2003). Les souris homozygotes cardiaques *HCN4*^{-/-} meurent au même stade embryonnaire que les embryons *HCN4*^{-/-} globaux. La mort embryonnaire est donc due à une dysfonction cardiaque. La fréquence cardiaque des embryons *HCN4*^{-/-} est fortement ralentie et n'est pas modulée par la concentration en AMPc. Dans leurs cardiomyocytes, le courant I_f est réduit de 80% et aucun potentiel d'action mature caractéristique des cellules du nœud

sinusal n'a pu être mis en évidence. Cette invalidation complète du gène *HCN4* chez la souris a permis de démontrer le rôle essentiel du canal HCN4 dans le développement du système de commande de l'activité électrique cardiaque.

L'inactivation du gène *HCN2* chez la souris est associée à des arythmies sino-atriales (Figure 18) et à une diminution d' I_f dans les cellules sinusales d'environ 30% (Ludwig *et al.*, 2003). Les cinétiques d'activation du courant *pacemaker* sont ralenties chez ces souris indiquant que cette sous-unité pourrait générer une composante rapide du courant I_f dans le nœud sinusal. La réponse à l'AMPc des cellules issues du nœud sinusal des souris *HCN2*^{-/-} est similaire à celle de cellules issues de souris sauvages, la sous-unité HCN4 doit donc être principalement responsable de la modulation de la fréquence cardiaque lors de stimulation d' I_f . Enfin comme les souris *HCN2*^{-/-} ne sont pas bradycardes et que le potentiel diastolique maximum de leurs cellules sinusales est hyperpolarisé par rapport à celui des cellules issues de souris sauvages, cette sous-unité doit plutôt participer à la stabilisation du rythme sinusal.

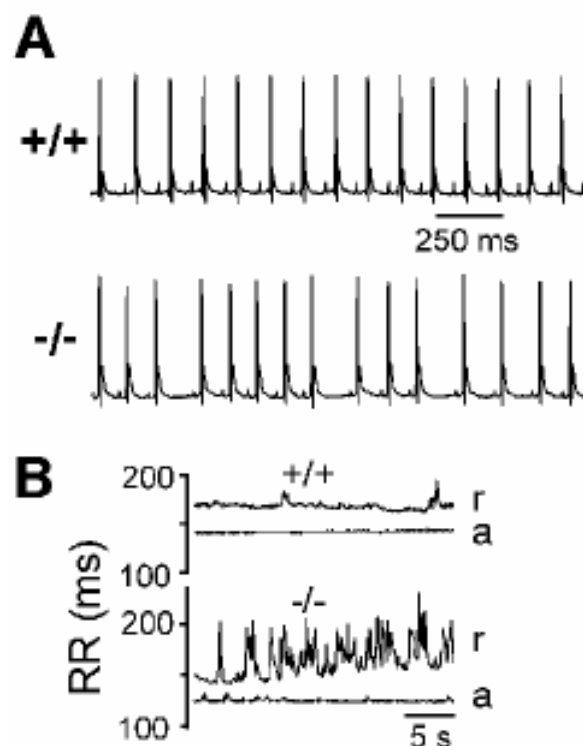


Figure 18 : **Dysfonction sinusale chez les souris *HCN2*^{-/-}.** A. ECG enregistrés par télémétrie chez une souris WT et une souris *HCN2*^{-/-} au repos. B. Evolution de l'intervalle RR en fonction du temps au repos (r) et en période d'activité (a) chez une souris WT et une souris *HCN2*^{-/-}. D'après Ludwig *et al.*, 2003.

♦ Avec perte de fonction du canal sodique SCN5A

L'étude de trois familles dans lesquelles 5 enfants en bas âge sont atteints de dysfonction sinusale sans autre maladie ou anomalie cardiaque a permis, par approche gène candidat, d'identifier 6 mutations sur le gène *SCN5A* (Benson *et al.*, 2003). Ces enfants présentaient une bradycardie sinusale sévère qui a nécessité l'implantation d'un *pacemaker*. Dans chaque famille, les enfants atteints sont porteurs de deux mutations différentes, l'une d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle. L'étude de ces mutations dans un système de réexpression hétérologue a mis en évidence que deux des six mutations (G1408R, R1623X) ne produisent pas de canal sodique fonctionnel. Les autres mutations modifient les propriétés biophysiques du canal sodique et plus particulièrement sa phase d'inactivation, ce qui induit une réduction de la densité du courant sodique à son maximum. Les mutations T220I, P1298L et delF1617 entraînent un dysfonctionnement modéré du canal. La mutation R1632H affecte sévèrement le canal en augmentant le temps de levée d'inactivation ou de réactivation. La durée normale entre deux dépolarisations devient dès lors insuffisante pour lui permettre de revenir à son état activable. Cette dysfonction se transmet selon un mode récessif, et dans chaque famille les membres atteints de dysfonction sinusale sont porteurs d'une mutation sévère associée à une mutation modérée. Les membres hétérozygotes de ces familles porteurs d'une de ces mutations sont asymptomatiques. Cependant, certains présentent des troubles de conduction cardiaque latents (bloc du premier degré). Il est intéressant de remarquer que les mutations delF1617 et R1623Q ont été associées au syndrome de QT long de type 3, et la mutation G1408R au syndrome de Brugada, deux troubles modifiant la repolarisation ventriculaire (Makiyama *et al.*, 2005 ; Kyndt *et al.*, 2001 ; Splawski *et al.*, 2000). Chez des patients ayant un syndrome de Brugada associé à une dysfonction sinusale, Makiyama *et al.* (2005) ont identifié 3 autres mutations perte de fonction sur le gène *SCN5A*. Il est important de noter que dans les syndromes chevauchants (QT long de type 3 et SSS, Brugada et SSS), une seule mutation à l'état hétérozygote est retrouvée. Les mécanismes cellulaires à l'origine de la dysfonction sinusale seraient soit un ralentissement de l'automatisme des cellules *pacemaker* soit un ralentissement de la conduction de l'influx électrique.

Enfin des mutations perte de fonction du gène *SCN5A* ont été mises en évidence chez des patients qui présentaient une forme familiale de paralysie auriculaire ("atrial standstill" en anglais) caractérisée par une bradycardie, une absence d'ondes P et l'émergence d'un rythme jonctionnel, sans aucune autre pathologie associée (Makita *et al.*, 2005 ; Takehara *et al.*, 2004, Groenewegen *et al.*, 2003). Deux de ces mutations étaient associées à un polymorphisme sur le gène de la connexine 40, une protéine assurant le couplage cellulaire exprimée plus spécifiquement dans l'oreillette (Makita *et al.*, 2005 ;

Groenewegen *et al.*, 2003). Cette association d'une mutation du gène *SCN5A* avec un polymorphisme de la connexine 40 pourrait expliquer la sévérité du phénotype observé ainsi que la prédominance du phénotype auriculaire chez ces patients, alors qu'avec les autres mutations du gène *SCN5A* des troubles de la conduction et/ou de la repolarisation cardiaque ont le plus souvent été observés.

Dans la partie "Résultats" de ce travail nous reviendrons sur les mécanismes cellulaires qui permettent d'expliquer la dysfonction sinusale observée chez ces patients, en partie mis en lumière par l'étude d'une souris invalidée pour le gène *Scn5a*.

♦ Avec perte de fonction des canaux calciques

A ce jour aucune mutation sur les gènes codant pour les canaux calciques dépendant du potentiel n'a été identifiée dans des cas de dysfonction sinusale. Mais des mutations gain de fonction du gène *CACNA1C* codant pour la sous-unité $\text{Ca}_v1.2/\alpha_{1C}$ des canaux calciques de type L sont responsables d'un syndrome incluant des arythmies cardiaques mortelles, dénommé syndrome de Timothy. Ce syndrome est multisystémique, comprenant à la fois des anomalies cardiaques (bradycardie, bloc atrioventriculaire, QT long avec tachycardie ou fibrillation ventriculaire), des déficiences du système immunitaire, une syndactylie et un déficit cognitif pouvant prendre la forme d'autisme chez certains enfants (Splawski *et al.*, 2004 ; Splawski *et al.*, 2005).

Des formes auto-immunes de bradycardie sinusale et de bloc auriculo-ventriculaire ont été rapportées chez des fœtus dont les mères possédaient des auto-anticorps dirigés contre les ribonucléoprotéines SSA/Ro et SSB/La. *In vivo*, l'immunisation de souris femelles avec la protéine recombinante SSA/Ro produit des anticorps anti-SSA/Ro et induit chez les petits une bradycardie sinusale et des troubles de la conduction atrio- et intra-ventriculaire (Boutjdir *et al.*, 1997). Des expériences similaires par administration d'IgG (immunisation passive) provenant de mères dont les enfants présentaient un bloc cardiaque congénital (BCC) chez la souris ont entraîné une bradycardie sinusale et un bloc AV du premier degré chez les souriceaux (Mazel *et al.*, 1999). Ces expériences laissaient supposer que ces anticorps pouvaient toucher des protéines impliquées dans l'automatisme et la conduction cardiaque, comme les canaux ioniques à expression cardiaque. Récemment dans le nœud sinusal chez le lapin, l'enregistrement des courants ioniques majeurs dans la dépolarisation diastolique (I_f , $I_{\text{Ca,L}}$ et $I_{\text{Ca,T}}$ et I_K) en présence et en absence d'anticorps issus de mères ayant eu des enfants avec un BCC, a mis en évidence l'inhibition des courants calciques tandis qu' I_f et I_K n'étaient pas touchés (Hu *et al.*, 2004). Il semblerait que les IgG réduiraient le

temps d'ouverture des canaux calciques et augmenteraient leur temps à l'état fermé. Précédemment, aucun effet sur les courants I_{Na} , I_{K1} et I_{to} n'avait été mis en évidence chez le rat (Boutjdir *et al.*, 1998).

Ces premières évidences cliniques confirmées expérimentalement ont mis en évidence le rôle essentiel des courants calciques dans la genèse du rythme cardiaque.

Par la suite, des souris transgéniques invalidées pour les gènes codant les sous-unités des canaux calciques de type L ($Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$) ont grandement fait progresser la connaissance des mécanismes de l'automatisme cardiaque. Deux études indépendantes successives ont démontré le rôle essentiel des canaux $Ca_v1.3$ (α_{1D}) dans l'activité *pacemaker in vivo* et *in vitro* des cardiomyocytes (Zhang *et al.*, 2002 ; Mangoni *et al.*, 2003). Les souris invalidées pour le gène *Cacna1d* ($Ca_v1.3^{-/-}$) présentent une dysfonction sinusale majeure, associant une bradycardie sévère et des arythmies sino-atriales (Figure 19, page 50) tandis que la fonction contractile est préservée (Matthes *et al.*, 2004). Cette dysfonction persiste *in vivo* après blocage du système nerveux autonome (Platzer *et al.*, 2000) et lorsque le cœur est explanté (Matthes *et al.*, 2004). *In vitro*, les cellules atriales et celles du nœud sinusal battent plus lentement et de manière irrégulière par rapport aux cellules isolées de souris sauvages, confirmant l'origine du phénotype observé *in vivo* (Mangoni *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Platzer *et al.*, 2000). Par la technique de patch-clamp, Mangoni *et al.* (2003) ont montré que l'invalidation de la sous-unité $Ca_v1.3$ chez la souris abolit entièrement le courant $I_{Ca,L}$ des cellules sinusales dans la gamme de potentiel de membrane correspondant à la dépolarisation diastolique. Le seuil d'activation des canaux $Ca_v1.3$ dans les cellules sinusales chez la souris est autour de -50 mV. Lors de l'application de noradrénaline, ce seuil est déplacé vers -55 mV. Parallèlement, *in vivo*, l'administration d'isoprénaline entraîne une accélération moindre du rythme cardiaque chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages. Ces données sont en accord avec l'absence d'activation d' $I_{Ca,L}$ chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ pour des potentiels correspondant à ceux de l'initiation de la dépolarisation diastolique, même lors de la stimulation par la noradrénaline des canaux $Ca_v1.2$ participant aussi à $I_{Ca,L}$.

Enfin, très récemment, l'étude de la susceptibilité aux troubles du rythme auriculaire des souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a permis de mettre en évidence que ces animaux pouvaient constituer un modèle d'étude de la maladie rythmique auriculaire, qui associe une dysfonction sinusale avec des pauses, une bradycardie, une incompetence chronotrope et des arythmies auriculaires. Ces souris présentent en effet un syndrome bradycardie-tachycardie (Figure 19, page 50), avec une fréquence cardiaque très lente à l'état de base, et le déclenchement systématique de troubles du rythme auriculaires (flutter ou fibrillation auriculaire) lors de stimulation endocavitaire programmée (Zhang *et al.*, 2005). Il serait intéressant de

poursuivre l'exploration de cette lignée de souris afin de savoir si la dysfonction sinusale (avec sévère bradycardie) peut être la cause de ces arythmies ou si la seule perte du courant calcique de type L dans les cellules atriales peut les engendrer.

La mise en évidence d'une dysfonction sinusale et de troubles du rythme auriculaire chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ est un argument qui favorise aujourd'hui la recherche en clinique de mutations sur ce gène dans les formes idiopathiques de dysfonction sinusale et de fibrillation auriculaire.

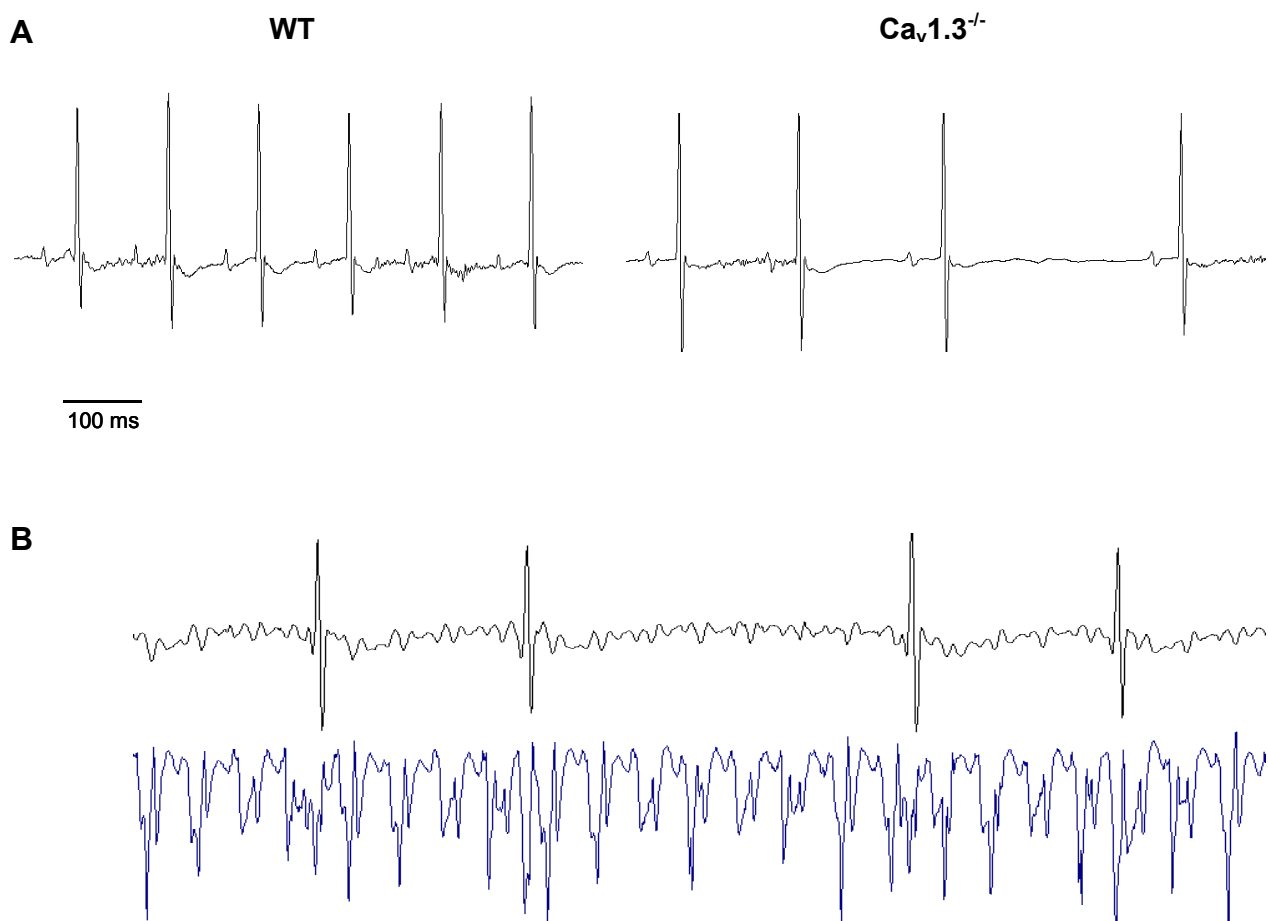


Figure 19 : Dysfonction sinusale et troubles du rythme auriculaire chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$. A) ECG enregistrés par télémétrie chez une souris WT et une souris $Ca_v1.3^{-/-}$. B) ECG de surface et ECG endocavitary correspondant en bleu chez une souris $Ca_v1.3^{-/-}$ présentant un épisode de tachyarythmie atriale déclenchée par stimulation atriale. Données non publiées du laboratoire.

L'exploration de la souris $Ca_v1.3^{-/-}$ a permis de souligner le rôle clé de cette sous-unité dans la régulation de l'activité *pacemaker* et la genèse du courant $I_{Ca,L}$, permettant de

distinguer son importance par rapport à celle de la sous-unité α_{1C} ($Ca_v1.2$) qui est, quant à elle, primordiale pour l'initiation de la contraction myocardique. Aujourd'hui une distinction doit être faite entre un courant $I_{Ca,L}$ *pacemaker* généré par la sous-unité $Ca_v1.3$ et un courant $I_{Ca,L}$ généré par $Ca_v1.2$ initiant la contraction des cardiomyocytes. En effet, l'expression de $Ca_v1.3$ est limitée au nœud sinusal, au nœud atrioventriculaire et aux oreillettes, et son abolition *in vivo* entraîne un ralentissement de l'activité *pacemaker* et de la conduction cardiaque comme nous le préciserons par la suite, sans toutefois altérer la contractilité cardiaque qui est elle sous la dépendance de la sous-unité $Ca_v1.2$.

Les différences fonctionnelles entre les deux types de sous-unités $Ca_v1.X$ ont été précisées grâce à une souris transgénique dont le site de liaison aux DHPs de la sous-unité $Ca_v1.2$ a été modifié pour le rendre insensible à ces inhibiteurs calciques (souris $Ca_v1.2DHP^{-/-}$). *In vivo*, la bradycardie induite par les DHPs est conservée chez les souris $Ca_v1.2DHP^{-/-}$, ce qui veut dire que chez la souris adulte la sous-unité qui participe à la dépolarisation diastolique est $Ca_v1.3$ (Sinnegger-Brauns *et al.*, 2004). De plus l'invalidation complète de la sous-unité $Ca_v1.2$ est létale chez l'embryon de souris. Une augmentation de la sous-unité $Ca_v1.3$ a été mise en évidence chez ces embryons ainsi que la présence d'un autre courant calcique de type L non encore identifié (Seisenberger *et al.*, 2000). Cette augmentation tenterait de compenser la perte de la sous-unité $Ca_v1.2$ mais ne suffirait pas à assurer la survie des embryons. Le rôle de cette sous-unité dans l'activité *pacemaker* chez l'adulte reste à déterminer. Il est probable qu'elle participe à la phase ascendante du potentiel d'action qui est calcium dépendante. Dans les cardiomyocytes contractiles, la sous-unité $Ca_v1.2$ est essentielle au couplage excitation-contraction.

Des souris invalidées pour les sous-unités α des canaux calciques de type T existent. Nous verrons dans la partie "Résultats" que l'exploration cardiovasculaire des souris $Ca_v3.1^{-/-}$ a permis de confirmer le rôle de cette sous-unité dans la genèse du rythme cardiaque. Par contre la sous-unité $Ca_v3.2$ ne semble pas participer au courant $I_{Ca,T}$ dans le nœud sinusal chez la souris adulte car les animaux invalidés pour cette sous-unité ne présentent pas d'arythmies cardiaques (Chen *et al.*, 2003). Toutefois la sous-unité $Ca_v3.2$ semble jouer un rôle dans l'activité *pacemaker* au cours du développement (Niwa *et al.*, 2004 ; Mizuta *et al.*, 2005).

◆ Avec perte de fonction du canal ERG

L'invalidation complète du gène ERG1 est létale chez la souris. Cette sous-unité serait donc essentielle au développement cardiaque (London *et al.*, 1998). L'invalidation complète du variant N terminal de ERG1, ERG1B, entraîne une bradycardie et un allongement de l'intervalle QT chez la souris (Lees-Miller *et al.*, 2003), attestant du rôle d'I_{Kr} dans la fonction sinusale. Toutefois, l'absence d'anomalie sinusale des souris surexprimant le dominant négatif du canal ERG1 humain (souris *αMHC-HERG-G628S*) suggère cependant un rôle mineur de ce courant dans le sinus chez la souris (Babij *et al.*, 1998).

◆ Avec perte de fonction de la protéine d'ancrage Ankyrine B

Tous les patients étudiés dans le syndrome du QT long de type 4 présentent également des épisodes de bradycardie sinusale qui alternent avec un rythme sinusal normal lors d'enregistrements électrocardiographiques sur 24 h (Schott *et al.*, 1995 ; Mohler *et al.*, 2003). La mutation sur le gène *Ank 2*, qui code l'Ankyrine B, incriminée dans le syndrome du QT long de type 4 semble donc aussi être responsable de dysfonction sinusale. Deux hypothèses sont émises : la mutation de cette protéine modifierait (i) l'homéostasie calcique dans les cellules du nœud sinusal et donc l'automatisme ou, (ii) altérerait l'organisation et l'ancrage des canaux des cellules périphériques du nœud sinusal ce qui perturberait la propagation de l'excitation électrique.

Les souris *Ank B^{-/-}* ne sont pas viables. Par contre les souris hétérozygotes (*Ank B^{+/-}*) présentent une dysfonction sinusale caractérisée par une bradycardie, une variation importante de leur fréquence cardiaque (pauses sinusales) et des épisodes isorythmiques de dissociation auriculo-ventriculaire (Mohler *et al.*, 2003). Certaines de ces caractéristiques ont été observées chez les patients porteurs de la mutation E1425G du gène *Ank 2*. Les arythmies observées chez les souris *Ank B^{+/-}* peuvent être expliquées par la diminution d'expression et la localisation membranaire anormale de l'échangeur Na/Ca et de la pompe Na/K ATPase. Le nombre et la localisation des canaux sodiques Na_v1.5 n'est par contre pas altéré (Mohler *et al.*, 2004).

À la différence des patients atteints, les paramètres ECG de conduction de la souris, les intervalles PR, QRS et la durée de l'onde P sont augmentés de façon significative par rapport aux souris sauvages. Par ailleurs, la mort subite chez la plupart des souris hétérozygotes est précédée d'un bloc auriculo-ventriculaire du second degré suivi d'épisodes prolongés d'arythmies ventriculaires polymorphes. Chez les patients, les décès ont été attribués à de la fibrillation ventriculaire.

♦ Avec gain de fonction du canal Kir2.1

La faible densité du courant I_{K1} dans les cellules automatiques autorise la dépolarisation spontanée de ces cellules. Lors de la sur-expression de Kir 2.1 (sous-unité principale du canal générant I_{K1}) dans le cœur de souris, des anomalies de l'excitabilité sont observées. La fréquence cardiaque des souris transgéniques est inférieure à celle des souris WT, des pauses sinuses et des épisodes de tachycardie atriale sont observés (Li *et al.*, 2004). La conduction auriculo-ventriculaire et intra-ventriculaire est également allongée.

d. Dysfonction sinusale associée à un désordre hormonal ou métabolique

Un déséquilibre métabolique ou hormonal peut entraîner chez l'homme des anomalies de la commande sinusale.

Les mécanismes cellulaires à l'origine de la bradycardie et de la tachycardie observées respectivement lors d'une hypo- ou d'une hyperthyroïdie ont été en partie élucidés grâce à l'étude de modèles de souris soit invalidés pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, soit présentant une hypo- ou une hyperthyroïdie induite expérimentalement (Gloss *et al.*, 2001 ; Le Bouter *et al.*, 2003). Chez les animaux hypothyroïdiens, une diminution de l'expression des canaux *pacemaker* HCN2 et HCN4 a été mise en évidence dans le cœur, tandis qu'une surexpression est notée lors d'une hyperthyroïdie. Par ailleurs, la diminution de l'expression de la sous-unité $K_v4.2$ chez les souris hypothyroïdiennes pourrait également participer à l'allongement du potentiel d'action des cellules sinuses et participer à la bradycardie observée. Il faut toutefois émettre une réserve sur ces résultats car ils ont été obtenus à partir de tissus ventriculaires et non sinusaux. Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes peuvent moduler les propriétés de facteurs de transcription. Cette modulation est certainement à l'origine des variations d'expression des canaux ioniques observées dans le cœur lors d'un changement du statut thyroïdien.

Des anomalies génétiques affectant l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie sont connues pour entraîner des désordres métaboliques graves pouvant être fatals. Ces anomalies peuvent toucher de jeunes enfants ou de jeunes adultes et se manifestent, en conditions de stress, par une hypoglycémie, une acidose métabolique, une hypothermie, et une dysfonction cardiaque. Un des gènes identifiés dans cette pathologie est celui de l'acyl-

CoA déshydrogénase à très longue chaîne (VLCAD, en anglais). Une souris invalidée par recombinaison homologue pour le gène de l'acyl-CoA déshydrogénase a été développée. L'exposition des souris VLCAD^{-/-} à un stress thermique (4°C) et alimentaire (jeûne) pendant 4 heures entraîne une bradycardie sinusale, une hypothermie et une hypoglycémie sévères, létales pour la majorité des animaux. Seulement 5% des souris VLCAD^{-/-} étaient vivantes 10 heures après l'exposition au stress. Par contre, toutes les souris sauvages exposées à des conditions expérimentales similaires ont survécu. Une administration de glucose associée à un réchauffement des animaux a permis de reverser les symptômes observés. La forte bradycardie observée doit être due à la conjonction de plusieurs facteurs, l'hypothermie, l'hypoglycémie et l'accumulation de graisses (lipidose) dans le cœur connue pour être toxique (Exil *et al.*, 2006).

C. Modèles murins et troubles de conduction auriculo-ventriculaire

1. Classification clinique des troubles de la conduction AV

Les blocs auriculo-ventriculaires peuvent être de trois niveaux différents dont la gravité est croissante (Figure 20) :

- Bloc du premier degré (bloc AV I) : toutes les impulsions atriales sont conduites aux ventricules mais avec retard ; la durée de la conduction AV, mesurée par la durée de l'intervalle PR, est allongée.
- Blocs du deuxième degré (bloc AV II) : un ou plusieurs, mais pas la totalité, des influx auriculaires qui devraient être conduits ne parviennent pas à atteindre les ventricules. Les blocs AV II sont divisés en deux groupes. Les blocs AV *de type Mobitz I* où la durée de l'espace PR s'allonge progressivement jusqu'au blocage de l'onde P. Cet allongement progressif de l'espace PR est appelé période de Luciani-Wenckebach. Les blocs AV *de type Mobitz II* où certaines ondes P ne sont pas conduites aux ventricules mais sans allongement préalable de l'espace PR. Un bloc AV II de type Mobitz I est en faveur d'une atteinte siégeant dans le nœud AV alors qu'un bloc AV de type Mobitz II est en faveur d'une atteinte infra-nodale, le plus souvent au niveau des branches ou du tronc du faisceau de His.
- Bloc du troisième degré (bloc AV III) où aucun des influx atriaux ne parvient aux ventricules.

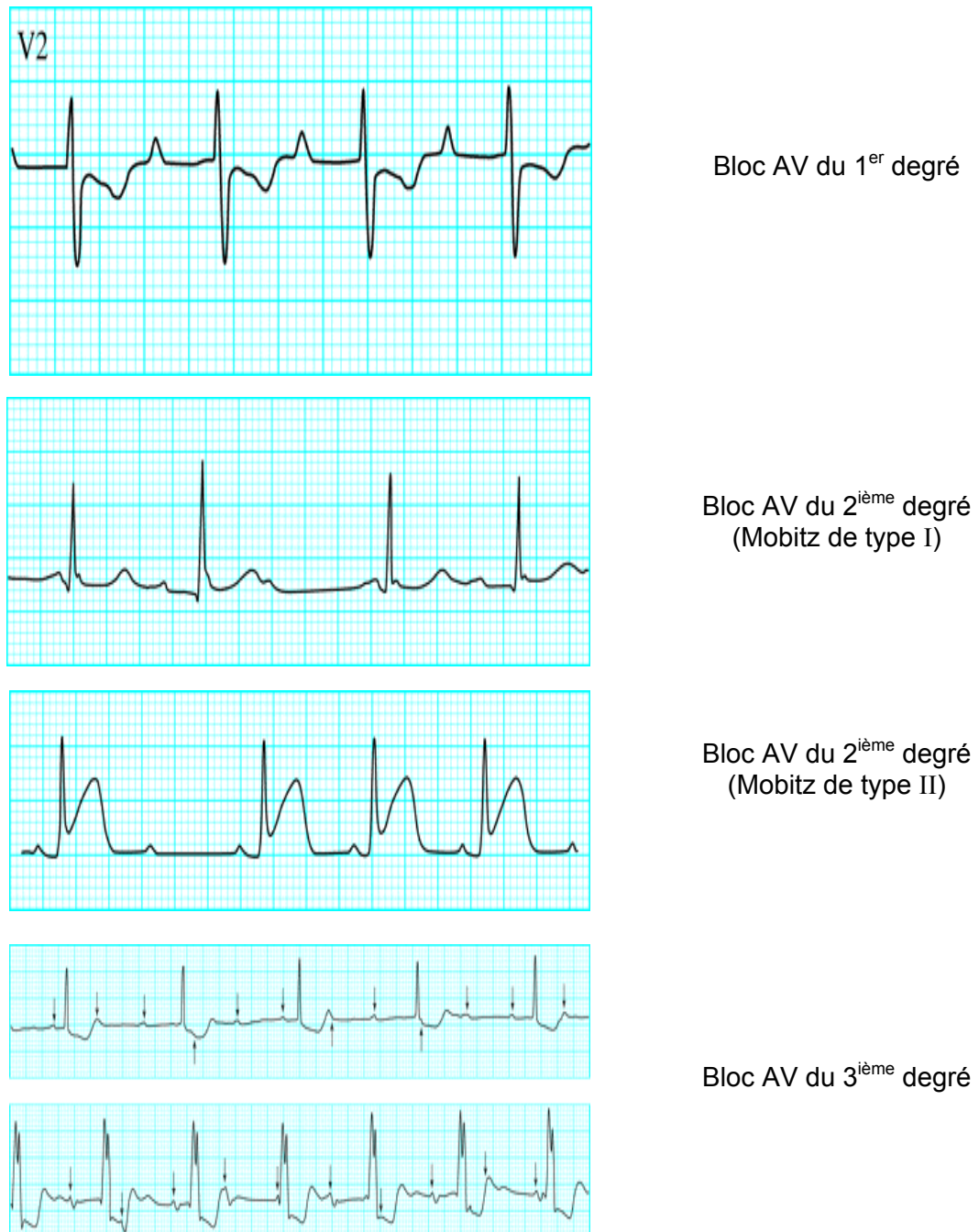


Figure 20 : Electrocardiogrammes associés aux blocs auriculo-ventriculaires de différents degrés D'après Da Costa *et al.*, 2002.

Lorsqu'un blocage plus ou moins complet de la conduction survient dans l'une des branches du faisceau de His, un bloc de branche peut être identifié à l'analyse électrocardiographique. L'onde d'activation ne rejoint les voies différenciées de conduction du ventricule correspondant qu'au-dessous de l'interruption par des trajets détournés et lents. Il en résulte un asynchronisme ventriculaire : le ventricule dont la branche est bloquée

se contracte avec retard par rapport au ventricule dont la branche est normale. Le bloc de branche peut être complet ou incomplet selon que l'interruption de la conduction dans la branche intéressée est totale ou partielle.

La localisation du bloc AV est définie cliniquement par rapport au 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 ou tronculaires correspondent à des lésions localisées sur le faisceau de His. Les blocs infrahissiens relèvent d'une atteinte bilatérale des voies de conduction intraventriculaire. Il est habituellement considéré que le bloc est d'autant plus grave qu'il est bas situé.

De nombreuses étiologies sont connues pour entraîner des troubles de conduction. La cause la plus fréquemment retrouvée est une dégénérescence progressive et idiopathique des voies de conduction comme initialement décrit par Lenègre (Lenègre & Moreau, 1963) et Lev (Lev, 1964). Cette étiologie représente selon les études de 33 à 69% des blocs AV chroniques (Davies, 1976 ; Hejtmancik *et al.*, 1956). Les autres étiologies fréquentes comprennent l'ischémie myocardique, les calcifications dues aux valvulopathies aortiques ou mitrales et les cardiomyopathies diverses. Enfin, d'autres cas existent, comme les tumeurs, les cardiopathies congénitales, les maladies du collagène et les atteintes traumatiques ou chirurgicales (Benson, 2004). Aujourd'hui la fréquence des étiologies ischémiques, que l'on retrouve essentiellement en cas d'infarctus antérieur massif a nettement diminué par rapport à ce qui avait été observé dans l'étude de Davies (1976). Cette diminution est à mettre en relation avec l'utilisation intensive des moyens de reperfusion à la phase aiguë de l'infarctus. Par contre, il est probable que l'augmentation du nombre de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque rende les blocs AV post-opératoires plus fréquents. Enfin, le vieillissement de la population est très certainement à l'origine d'une augmentation des blocs AV dégénératifs qui touchent préférentiellement les personnes âgées. Les étiologies les plus fréquemment retrouvées comprennent les anomalies de développement ou congénitales, les traumatismes ou ischémies d'une des structures de conduction, ou enfin des formes héréditaires idiopathiques de troubles de conduction (Wolf & Berul, 2006).

D'une manière générale, les troubles de conduction qui sont associés à une anomalie de l'architecture cardiaque sont à distinguer de ceux qui surviennent sur un cœur apparemment sain (Figure 21, page 57). Cependant il peut parfois y avoir certains chevauchements dans cette classification (Smits *et al.*, 2005).

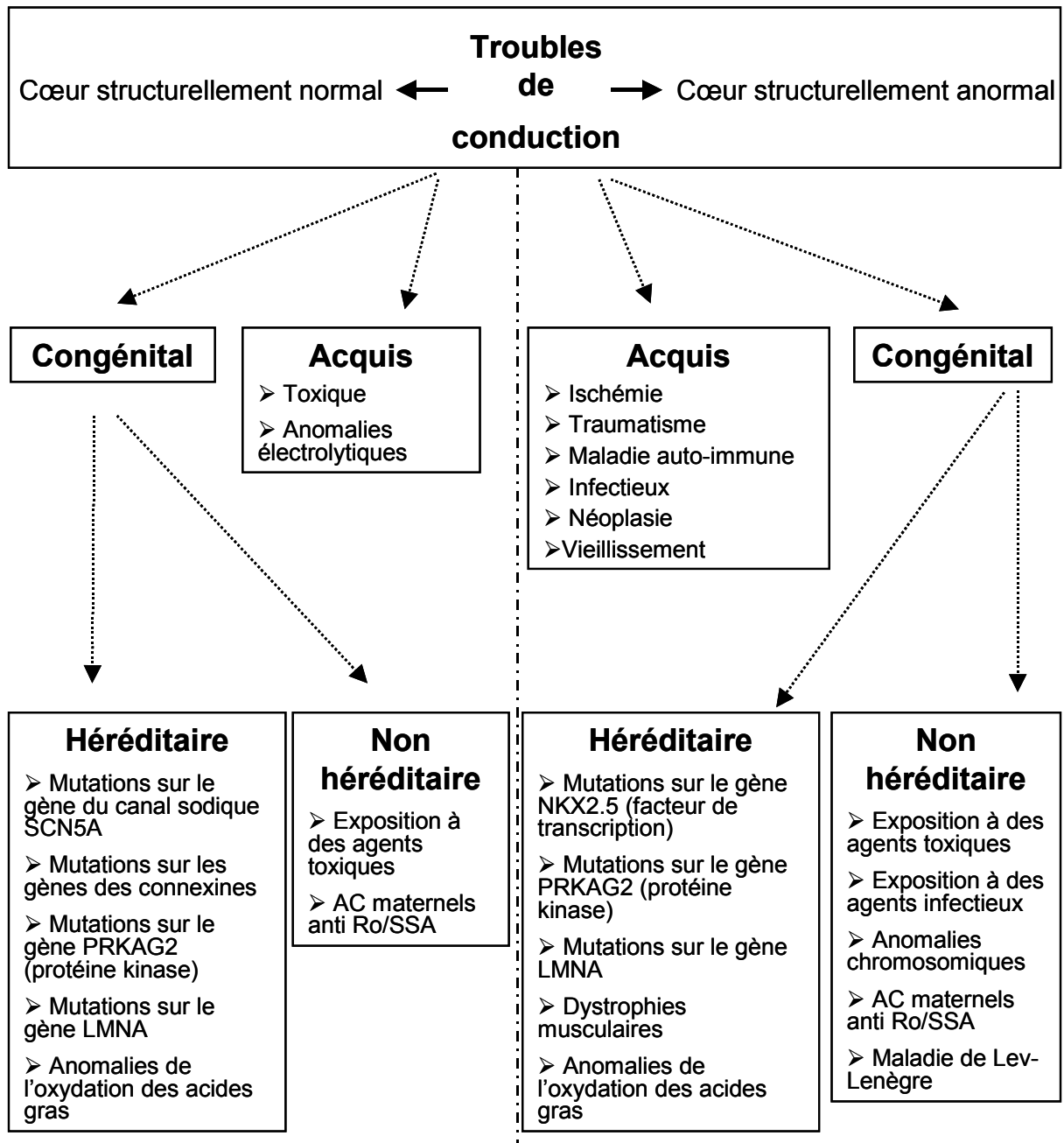


Figure 21 : Etiologies des troubles de conduction auriculo-ventriculaire. AC, anticorps. D'après Smits *et al.*, 2005.

2. Modèles murins de troubles de la conduction AV

a. Troubles de conduction associés à des anomalies cardiaques structurales

Des anomalies anatomiques constituant un obstacle à la propagation normale de l'influx cardiaque peuvent entraîner des troubles de conduction. Il peut s'agir d'anomalies micro- ou macroscopiques situées à n'importe quel endroit du système de conduction. Ces anomalies structurales peuvent aller de l'absence partielle ou totale des structures du système de conduction à une infiltration fibreuse, graisseuse ou calcaire du tissu de conduction normal.

De nombreuses cardiopathies peuvent être associées à des troubles de conduction. L'infarctus du myocarde est la cause la plus fréquente des blocs AV transitoires. La régression du bloc est la règle, notamment lorsque l'infarctus est de siège postérieur. Les cardiomyopathies dilatées, qu'elles soient ischémiques ou d'une autre origine, s'accompagnent facilement d'un bloc de branche gauche. Les cardiopathies valvulaires, surtout aortiques, sont également une cause classique de blocs chroniques. Les cardiopathies hypertensives et les cardiomyopathies hypertrophiques s'accompagnent parfois d'un bloc de branche gauche. Les cardiopathies congénitales qui peuvent être associées à des troubles de conduction sont par exemple la transposition des gros vaisseaux, les défauts de septation (communication inter-ventriculaire et communication inter-auriculaire), la persistance du canal artériel, la tétralogie de Fallot et les rétrécissements pulmonaire ou aortique.

Des maladies inflammatoires, infectieuses, métaboliques, tumorales et systémiques peuvent se compliquer de troubles de conduction : amylose cardiaque, tumeurs cardiaques malignes primitives (sarcomes) ou secondaires, hémopathies malignes (maladie de Hodgkin), syphilis, hémochromatose, goutte, oxalose, sarcoïdose, maladie de Marfan, maladie de Chagas, maladie de Lyme, rhumatisme articulaire aigu, diphtérie, myocardites virales et endocardites infectieuses.

Les maladies auto-immunes peuvent atteindre l'ensemble du système cardiovasculaire, y compris le tissu de conduction spécialisé. Les troubles de conduction observés chez les adultes atteints de maladies auto-immunes peuvent répondre de plusieurs mécanismes plus ou moins associés (Maisch *et al.*, 2001) : processus de myocardite atteignant les fibres nodales (lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde, polymyosite) ; dépôts amyloïdes (polyarthrite rhumatoïde) ; ischémie myocardique (vascularites, lupus érythémateux disséminé) ; fibrose du tissu de conduction (sclérose

systémique) ; auto-anticorps anti-tissu de conduction (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé).

Les dystrophies musculaires et la myotonie de Steinert peuvent s'accompagner de troubles de conduction, avec ou sans cardiomyopathie cliniquement patente associée.

Enfin, les traumatismes cardiaques et la chirurgie cardiaque (remplacements valvulaires prothétiques, fermeture de communications interventriculaires, réparation d'un canal atrio-ventriculaire) sont également une cause de blocs AV plus ou moins chroniques.

Parmi les étiologies citées plus haut de troubles de conduction associés à une atteinte de l'architecture cardiaque, certaines ont une origine génétique aujourd'hui clairement identifiée, et des modèles de souris transgéniques ont permis de confirmer que des mutations sur ces gènes étaient causales.

◆ Anomalies de septation cardiaque

Les défauts de septation de type communication inter-auriculaire (CIA) et inter-ventriculaire (CIV) résultent d'anomalies lors du processus embryogénique de formation des cloisons inter-auriculaire et inter-ventriculaire. Ils peuvent s'observer dans le cadre d'anomalies chromosomiques telles que le syndrome de Down (trisomie 21), d'Edwards (Trisomie 18), de Patau (Trisomie 13) ou de Turner (monosomie X). Toutefois, la majorité des patients atteints n'a pas d'anomalie chromosomique. Ces malformations cardiaques sont souvent associées à un bloc AV de siège nodal, qui peut déjà être présent *in utero* ou se manifester plus tard dans la vie.

Dans un modèle de trisomie 21 chez la souris, Shinohara *et al.* (2001) ont mis en évidence des malformations conotruncales, des défauts de septation ventriculaire et des anomalies de la jonction auriculo-ventriculaire avec dysplasies valvulaires. De manière similaire, un modèle de souris mime la trisomie associée à une translocation du chromosome 2. Comme les patients, les souris présentent des anomalies cardiaques congénitales, comprenant principalement des défauts de septation, des transpositions des gros vaisseaux et des cardiomyopathies. Ces anomalies sont liées à la surexpression d'un facteur de transcription, *Lbh* (limb-bud & heart) qui régule l'activité des facteurs de transcription *Tbx5* et *Nkx2.5*.

Les défauts de septation cardiaque peuvent survenir dans le cadre d'une atteinte familiale. C'est dans de telles familles que des mutations dans les gènes *NKX2.5* (Schott *et al.*, 1998) et *TBX5* (Mori & Bruneau, 2004) ont pu être identifiées.

NKX2.5 est un gène codant pour un facteur de transcription homéotique impliqué dans la différenciation cellulaire et le développement cardiaque. Il intervient notamment dans les processus de septation cardiaque, de différenciation conotruncale, de formation des valves cardiaques et de maturation du tissu de conduction spécialisé à partir des précurseurs mésodermiques. Des mutations causales dans ce gène ont été retrouvées dans des formes familiales de défauts de septation cardiaque (type CIA ou CIV), associés à des troubles de conduction à l'étage nodal, sans anomalies extracardiaques (Schott *et al.*, 1998). Des mutations de ce gène sont également retrouvées chez des patients atteints d'autres types de cardiopathies congénitales, notamment la tétralogie de Fallot, le ventricule droit à double issue, le troncus arteriosus et l'interruption de l'arche aortique (McElhinney *et al.*, 2003). L'inactivation du gène *Nkx2.5* chez la souris entraîne une hypoplasie du nœud AV qui se traduit cliniquement par un allongement de l'intervalle PR, lié à une atteinte suprahissienne (intervalle AH prolongé) (Jay *et al.*, 2004). Par contre, contrairement à ce qui est observé chez les patients, la conduction ventriculaire est également altérée.

Certaines mutations particulières seraient responsables d'un bloc AV progressif isolé de 2^e ou 3^e degré, sans malformation apparente (Kasahara *et al.*, 2000). Une souris transgénique exprimant l'allèle muté I183P du gène *Nkx2.5* dans le cœur a été réalisée (Kasahara *et al.*, 2001). Celle-ci présente un phénotype de troubles de conduction auriculo-ventriculaire progressifs et d'insuffisance cardiaque sans anomalie anatomique. Ce phénotype est proche de celui des patients présentant une mutation dans le gène *NKX2.5*. Une étude détaillée chez ces souris transgéniques a montré une diminution de l'expression des connexines 40 et 43 qui serait responsable des troubles de conduction. Les gènes des connexines pourraient donc être des cibles directes du facteur de transcription *Nkx2.5* ou bien des cibles indirectes par l'intermédiaire d'autres gènes (Seul *et al.*, 1997).

Des mutations dans le gène *TBX5* sont retrouvées chez 70% des patients atteints du syndrome atrio-digital de Holt-Oram, un syndrome poly-malformatif transmis sur le mode autosomique dominant associant des anomalies cardiaques (communication inter-auriculaire ou inter-ventriculaire et troubles du rythme et de la conduction) et squelettiques (pouces ayant l'aspect d'un doigt radial) (Heinritz *et al.*, 2005). *TBX5* est un gène homéotique codant pour une protéine régulant le processus embryogénique de septation cardiaque. Bruneau *et al.* (2001) ont généré une souris invalidée pour le gène *Tbx5*. A l'état homozygote, les animaux ne sont pas viables et meurent à un stade précoce du développement. Chez les souris *Tbx5*^{+/-}, des défauts de septation atriale et ventriculaire sont observés. Au cours d'enregistrements électrocardiographiques, des anomalies de conduction ont été mises en évidence, allongement de la durée de l'onde P, de l'intervalle PQ, et présence de blocs AV

du second degré. Des pauses sinusales fréquentes ont également été observées (Figure 22).

Dans le syndrome de Holt-Oram, des anomalies de conduction peuvent être observées en l'absence de malformations cardiaques. L'étude de ce modèle a permis en partie d'expliquer l'origine des troubles de conduction dans ce syndrome. L'haploinsuffisance de *Tbx5* réduit fortement la transcription du gène de la connexine 40, élément déterminant de la conduction de l'influx électrique cardiaque ; et les souris *Tbx5*^{+/-} présentent des anomalies de conduction similaires à celles observées chez les souris *Cx40*^{-/-} (Hagendorff *et al.*, 1999). Enfin, cette même étude a permis de montrer l'interaction entre *Tbx5* et *Nkx2.5* dans la régulation de l'expression du gène de la Cx40.

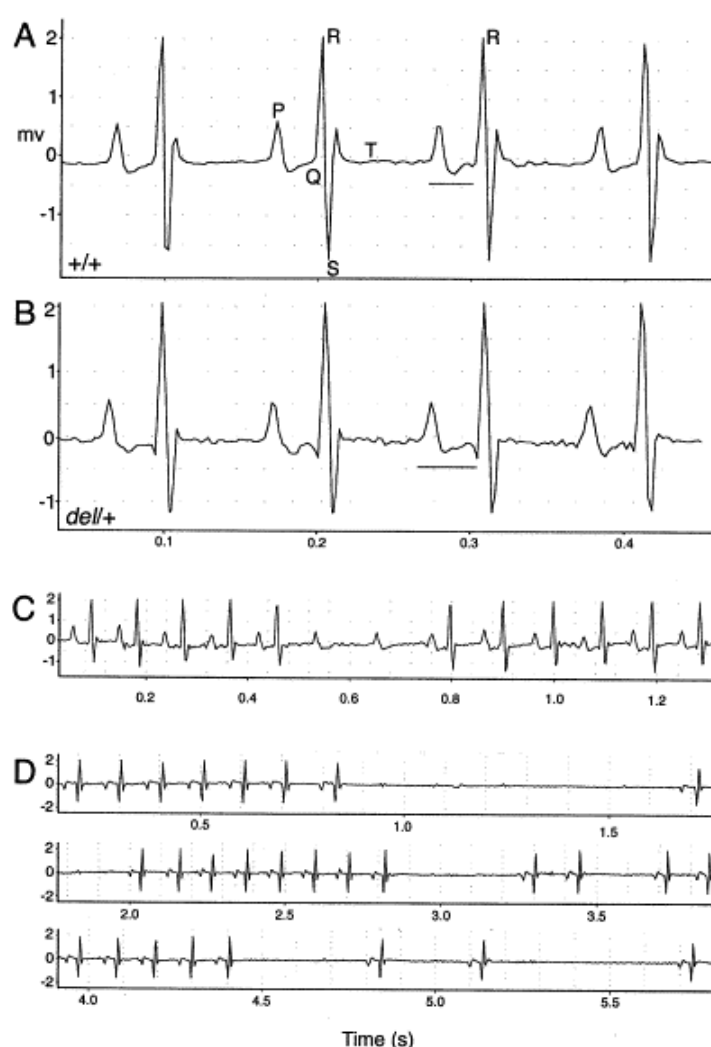


Figure 22 : Tracés ECG de souris WT ou *Tbx5*^{+/-}. Allongement de l'intervalle PQ chez la souris *Tbx5*^{+/-} (B) par rapport à la souris WT (A). Bloc AV de 2^{ème} degré (C) et pauses sinusales (D) chez une souris *Tbx5*^{+/-}. D'après Bruneau *et al.*, 2001.

♦ Anomalies des protéines du cytosquelette

Le cytosquelette joue un rôle important dans la structure du myocyte et est impliqué dans la signalisation intracellulaire. Des mutations du gène *LMNA* codant pour la lamine A/C ont été identifiées comme étant à l'origine de la forme autosomique dominante de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss et de cardiomyopathies dilatées avec troubles de conduction transmises sur le mode autosomique dominant (Bonne *et al.*, 1999 ; Fatkin *et al.*, 1999). Les troubles de conduction associés aux mutations de la lamine A/C peuvent concerner l'ensemble du système de conduction, du nœud sinusal aux fibres de Purkinje (Sanna *et al.*, 2003). Certains individus mutés ont des troubles de conduction mais n'ont pas d'atteinte décelable de l'architecture cardiaque. Il s'agit généralement du premier symptôme précédant l'apparition d'une cardiomyopathie dilatée cliniquement patente (Hershberger *et al.*, 2002).

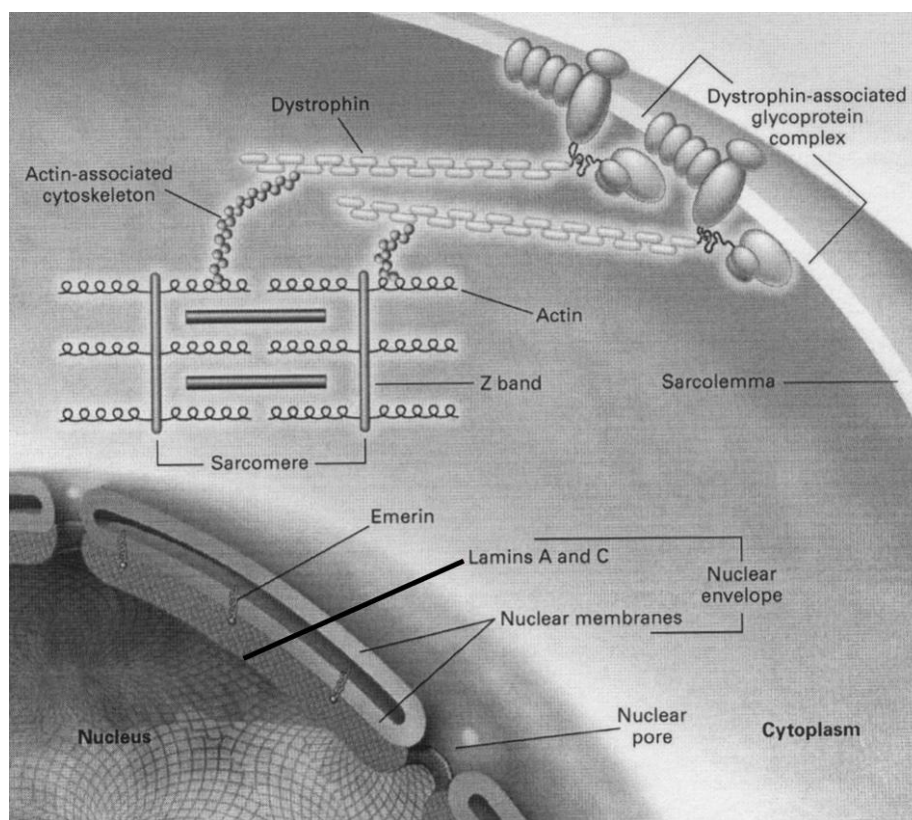


Figure 23 : **Cytosquelette du myocyte.** Localisation des Lamines A et C à la face interne de la membrane nucléaire. D'après Fatkin *et al.*, 1999.

Les lames sont des constituants de la lamina nucléaire qui est une couche fibreuse tapissant la face interne de la membrane nucléaire (Figure 23). Elles réagissent avec la chromatine et les protéines de la membrane nucléaire interne. Elles ont la même localisation

à la membrane nucléaire que l'émerine, impliquée dans la forme liée à l'X de la myopathie d'Emery-Dreifuss. Les mécanismes physiopathologiques de l'atteinte musculaire squelettique et myocardique ont en partie été élucidés grâce à des modèles de souris générés soit par invalidation du gène de la lamine ou de l'émerine, soit par l'introduction de mutations identifiées chez les patients dans le gène de la lamine. Selon les modèles, les anomalies locomotrices sont retrouvées, ainsi que les troubles de conduction auriculo-ventriculaire (Figure 24), mais dans certains modèles aucune cardiomyopathie n'est associée (Nikolova *et al.*, 2004 ; Arimura *et al.*, 2005 ; Ozawa *et al.*, 2006). Les anomalies des lamines semblent perturber les fonctions nucléaires et provoquer un phénomène d'apoptose qui pourrait rendre compte de l'infiltration fibreuse et lipidique du myocarde observée, y compris du système de conduction (Nikolova *et al.*, 2004 ; Arimura *et al.*, 2005 ; Wolf *et al.*, 2006). Elles pourraient aussi perturber les interactions de la lamine avec les protéines cytoplasmiques du sarcomère, du cytosquelette et du sarcolemme (Fatkin *et al.*, 1999).

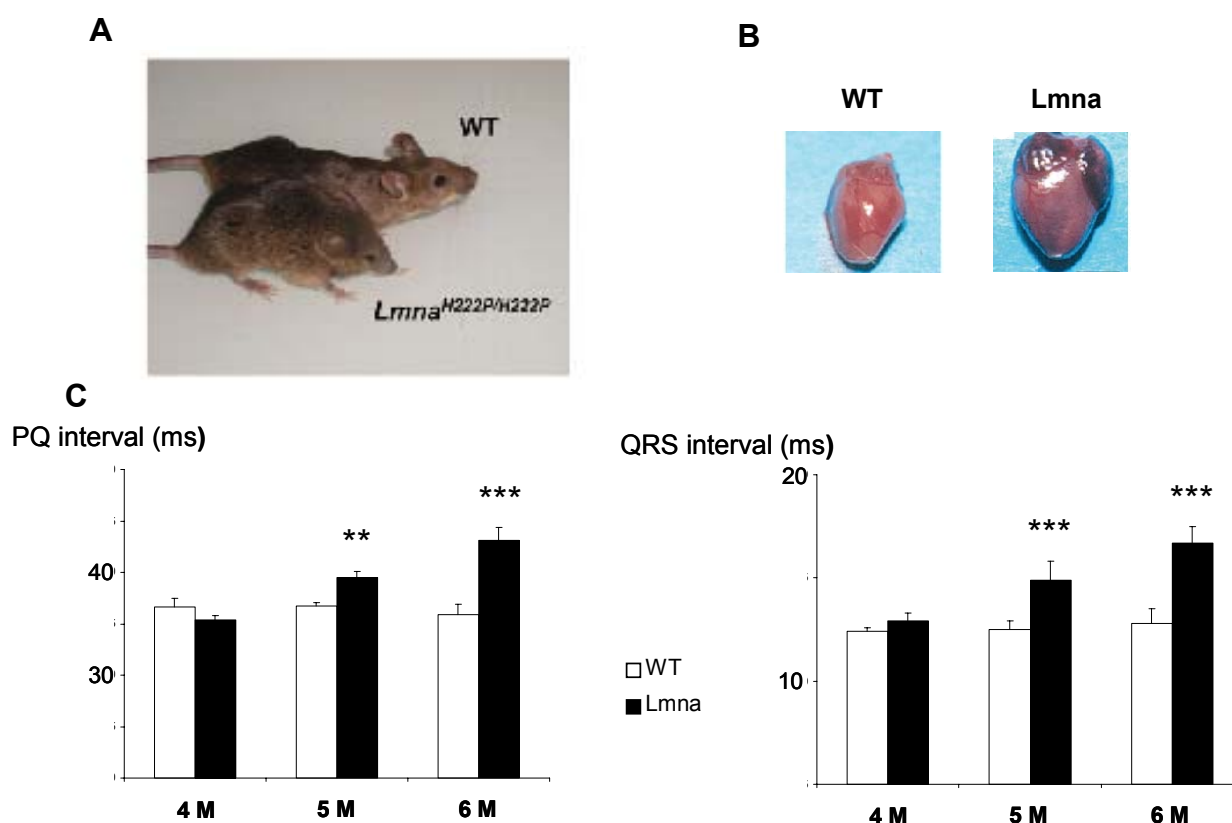


Figure 24 : **Modèle murin de la maladie d'Emery-Dreifuss surexprimant la mutation H222P du gène *Lmna*.** Le tableau clinique regroupe des anomalies de posture (A), une cardiomyopathie dilatée apparaissant dès l'âge de 3 mois (B) et des troubles de conduction (C) consécutifs à la cardiomyopathie apparaissant à l'âge de 5 mois. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus WT. D'après Arimura *et al.*, 2005 et des données non publiées du laboratoire.

Les souris invalidées pour le gène de l'émerine à l'état homozygote ou hétérozygote ne présentent aucune anomalie cardiaque ou squelettique jusqu'à un âge avancé. Une étude comparative *in vitro* des fibroblastes issus de souris invalidées pour l'émerine ou la lamine A/C a permis de mettre en évidence que la perte de fonction du gène de la lamine était plus délétère sur l'architecture nucléaire et la réponse à un stress mécanique, que la perte du gène de l'émerine. L'émerine est par ailleurs connue pour moduler l'expression de certains gènes (de structure ou de signalisation), lui conférant des propriétés antiapoptotiques qui permettraient d'expliquer les phénomènes d'apoptose retrouvés à l'analyse des biopsies musculaires de patients porteurs de mutations perte de fonction sur le gène de l'émerine (Lammerding *et al.*, 2005).

Des cardiomyopathies peuvent aussi être observées chez l'homme lors de délétions ou de mutations faux-sens dans le gène de la desmine. Ce gène code pour une sous unité constitutive des filaments intermédiaires dans les muscles squelettiques et cardiaques. Les patients présentent par ailleurs une faiblesse musculaire qui touche les muscles des membres proximaux et distaux mais aussi ceux du cou et du tronc. Une souris délétée pour le gène de la desmine (souris D7-des) a été générée, et reproduit le phénotype cardiaque des patients. Une accumulation de desmine est observée dans les cardiomyocytes, ainsi qu'un mauvais alignement des myofibrilles et une rupture des filaments intermédiaires. Par ailleurs, un remodelage des jonctions inter-cellulaires existe chez ces souris avec une réduction du nombre de jonctions gap et une diminution de la connexine 43 au niveau des disques intercalaires. En accord avec ces résultats, la conduction ventriculaire mesurée par cartographie épicardique (Figure 25) est ralentie chez les souris D7-des (Gard *et al.*, 2005). L'intégrité de cette protéine est donc essentielle au couplage intercellulaire dans le cœur, et de ce fait à la propagation normale de l'influx électrique cardiaque.

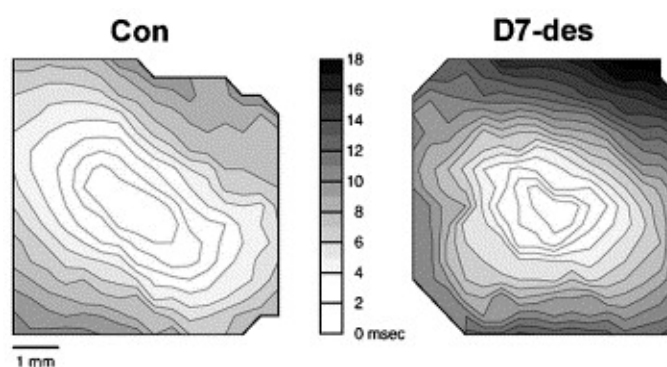


Figure 25 : Ralentissement de l'activation du myocarde ventriculaire chez les souris invalidées pour le gène de la desmine (D7-des). Cartes d'activation enregistrées à partir d'un cœur de souris contrôlée (Con) et de souris D7-des. Dans les deux cœurs, une propagation anisotrope est observée mais la conduction dans le cœur de la souris D7-des est plus lente. D'après Gard *et al.*, 2005.

Parmi les protéines rentrant dans la composition des jonctions intercellulaires, la N-cadhérine pourrait être un nouveau candidat dans les formes héréditaires de cardiomyopathies. C'est ce que laisse à penser un modèle de souris invalidée pour le gène de la N-cadhérine. En effet, la délétion conditionnelle de ce gène entraîne chez la souris une cardiomyopathie dilatée, avec des troubles de conduction AV sévères et des troubles du rythme ventriculaire conduisant à une mort subite des animaux. Des arythmies atriales ont également été rapportées dans ce modèle. Ce phénotype arythmique est accompagné d'une diminution de l'expression des connexines 40 et 43 au niveau des jonctions gap dans les tissus atriaux et ventriculaires (Li *et al.*, 2005).

Contrairement aux cardiomyopathies de type dilaté observées dans les cas précédents, des anomalies des protéines de l'appareil contractile, comme l'actine ou la myosine, entraînent le plus souvent des cardiomyopathies de type hypertrophique. Des formes familiales de cardiomyopathie hypertrophique ont permis d'identifier plus de 100 mutations sur 10 gènes différents, tous codants pour des protéines du sarcomère (Lombardi & Betocchi, 2002). Parmi ces gènes figurent ceux de l' α -actine et de la myosine. Les souris invalidées pour l' α -actine cardiaque ne sont pas viables du fait d'anomalies cardiaques liés à des myofilaments défectueux et des phénomènes majeurs d'apoptose (Abdelwahid *et al.*, 2004).

Des anomalies de conduction peuvent être la manifestation cardiaque première et prédominante d'une cardiomyopathie dilatée ou d'une dystrophie musculaire, survenant en l'absence ou avant toute atteinte de l'architecture cardiaque cliniquement détectable (Fatkin *et al.*, 1999). Il est possible dans ces cas que des mutations des gènes codant pour des protéines du cytosquelette altèrent directement ou indirectement la fonction des canaux ioniques (Smits *et al.*, 2005). La mise en évidence d'interactions entre certains canaux ioniques et des protéines du cytosquelette supportent cette hypothèse (Maltsev *et al.*, 1997). Par exemple la syntrophine $\gamma 2$, une protéine du cytosquelette, interagit avec la sous-unité α du canal sodique ($\text{Na}_v1.5$) ; elle module son expression membranaire et ses propriétés d'activation (Ou *et al.*, 2003). De plus, la syntrophine $\gamma 2$ s'associe avec une protéine de la membrane cellulaire, l'ankyrine, qui elle-même, chez le rat, interagit avec les sous-unités β régulatrices du canal sodique (Malhotra *et al.*, 2000). Ces mêmes sous-unités β régulatrices du canal sodique interagissent par l'intermédiaire de leur domaine extracellulaire avec les protéines de la matrice extracellulaire (Srinivasan *et al.*, 1998).

De même, la dystrophine interagit avec la sous-unité α du canal sodique cardiaque ($\text{Na}_v1.5$). Chez les souris déficientes en dystrophine (mdx), la protéine $\text{Na}_v1.5$ et le courant I_{Na} sont diminués dans le tissu ventriculaire. Des anomalies de conduction intraventriculaire

ont été mises en évidence chez ces animaux (Gavillet *et al.*, 2006). Ces résultats permettent en partie d'expliquer les troubles de conduction observés chez certains patients atteints de myopathie de Duchenne, porteurs de mutations du gène de la dystrophine.

Enfin, il a été démontré qu'une désorganisation structurale du cytosquelette des myocytes pouvait altérer les densités et les cinétiques des canaux sodiques, calciques et K(ATP) et donc modifier l'excitabilité des myocytes (Undrovinas *et al.* 1995, Undrovinas *et al.* 1998).

Ainsi des anomalies du cytosquelette peuvent être impliquées dans des anomalies de la conduction cardiaque, d'origine aussi bien fonctionnelle que structurale. Ces troubles peuvent résulter d'effets directs de mutations sur les gènes codant des protéines du cytosquelette mais aussi venir de la modification secondaire de la fonction de canaux ioniques essentiels à la propagation de l'influx électrique dans le cœur.

◆ Anomalies du métabolisme cellulaire

i. Métabolisme glucidique

Le gène *PRKAG2* code pour la sous-unité $\gamma 2$ régulatrice de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Cette enzyme est impliquée dans la régulation du transport cellulaire du glucose et dans le processus de glycogénolyse. Des mutations faux-sens dans le gène *PRKAG2* entraînant une activité constitutive de l'AMPK provoquent des cardiopathies hypertrophiques de surcharge en glycogène et des anomalies électrophysiologiques, en particulier un syndrome de Wolff-Parkinson-White, des troubles de conduction auriculo-ventriculaire progressifs et de la fibrillation auriculaire (Blair *et al.*, 2001 ; Gollob *et al.*, 2001 ; Arad *et al.*, 2002). Cette pathologie doit être distinguée des cardiomyopathies hypertrophiques associées à des mutations dans des gènes codant pour des protéines du sarcomère, caractérisées histologiquement par une désorganisation des myofibrilles. En effet, en ce qui concerne les cardiopathies hypertrophiques associées à des mutations de *PRKAG2*, l'examen histologique du cœur met en évidence dans les myocytes cardiaques des vacuoles contenant des polysaccharides, et l'absence de désorganisation des myofibrilles (Arad *et al.*, 2002).

Les mécanismes à l'origine des troubles de conduction ne sont pas clairement élucidés. Ils pourraient être la conséquence de l'infiltration en glycogène des cardiomyocytes du tissu de conduction. Quant au syndrome de Wolff-Parkinson-White, un modèle animal

surexprimant une mutation identifiée dans le gène *PRKAG2* chez l'homme suggère qu'il pourrait être la conséquence de la rupture de l'intégrité de l'anneau fibreux (qui normalement isole électriquement les oreillettes des ventricules) par des myocytes chargés en glycogène. En plus des anomalies de conduction AV, en vieillissant, ces souris développent des anomalies de la commande sinusale, avec épisodes de bradycardie et de tachycardie supraventriculaire associées à des morts subites (Patel *et al.*, 2003 ; Arad *et al.*, 2003).

Il existe également une mutation du gène de la *PRKAG2* qui entraîne chez des patients uniquement un syndrome de Wolff-Parkinson-White, de la fibrillation auriculaire et des blocs AV sans cardiopathie hypertrophique cliniquement décelable (Gollob *et al.*, 2001). Pour les auteurs, ceci suggère un rôle important de l'AMPK dans la régulation de la fonction des canaux ioniques cardiaques. Cette mutation pourrait avoir un effet sur la conduction cardiaque en modifiant le degré de phosphorylation de canaux ioniques. En faveur de cette hypothèse, il a été montré dans un modèle d'expression cellulaire qu'une mutation entraînant une activité constitutive de l'AMPK (mutation T172D) modifiait les propriétés d'inactivation du canal sodique cardiaque humain (Light *et al.*, 2003).

ii. Métabolisme lipidique

Les anomalies de l'oxydation des acides gras sont des erreurs innées du métabolisme résultant de défauts enzymatiques affectant le transport et le métabolisme des acides gras. Ces affections sont rares mais probablement sous-estimées. Selon le déficit enzymatique, une atteinte cardiaque peut être présente, se traduisant par une cardiomyopathie et/ou des troubles du rythme et de la conduction. Les patients ayant un défaut dans les enzymes régulant le transport mitochondrial des acides gras à chaîne longue (déficit en carnitine palmitoyl transférase de type II, et déficit en carnitine-acylcarnitine translocase) ont une atteinte cardiaque caractérisée par un bloc auriculo-ventriculaire et des arythmies atriales isolées, sans atteinte cardiaque structurale (Bonnet *et al.*, 1999 ; Saudubray *et al.*, 1999).

La physiopathologie des troubles de conduction et des autres manifestations cliniques fait appel à l'accumulation cellulaire de métabolites d'acides gras à chaînes longues consécutive au défaut enzymatique. Ces métabolites peuvent d'une part avoir une toxicité pour le myocyte, et d'autre part affecter la fonction des canaux ioniques et des jonctions gap. Il a été montré en effet qu'ils réduisaient le courant potassique à rectification entrante et le courant sodique, qu'ils activaient les canaux calciques et qu'ils altéraient les interactions entre hémi-canaux des jonctions gap (Bonnet *et al.*, 1999). A l'exception de

l'effet sur les canaux calciques, ces altérations ont un effet dépresseur sur la conduction intracardiaque.

Dans les modèles de dysfonction sinusale, nous avons présenté un modèle murin invalidé pour le gène codant l'acyl-CoA déshydrogénase à très longue chaîne, enzyme impliquée dans la dégradation mitochondriale des acides gras. Aucune anomalie de conduction n'est rapportée dans ce modèle, seule une dysfonction sinusale est évoquée (Exil *et al.*, 2006).

iii. Homéostasie calcique

L'homéostasie calcique est un élément déterminant du bon fonctionnement des cardiomyocytes. La modification de l'expression de protéines régulant la concentration intracellulaire en calcium peut entraîner des anomalies cardiaques structurales et des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire. Par exemple, la surexpression cardiaque de la calréticuline induit chez la souris une cardiomyopathie dilatée, associée à une bradycardie sinusale et des troubles de conduction AV pouvant aller jusqu'au bloc complet. Une diminution du courant $I_{Ca,L}$ a été mise en évidence dans les cardiomyocytes chez ces souris, ainsi qu'une diminution de l'expression des connexines 40 et 43 (Nakamura *et al.*, 2001). Ces résultats permettent d'expliquer les défauts de conduction et d'excitabilité observés chez ces animaux. Le gène de la calréticuline pourrait donc constituer un nouveau gène candidat dans les formes familiales de cardiomyopathie associées à des troubles de conduction AV.

b. Troubles de conduction survenant sur un cœur apparemment sain

Il s'agit ici de troubles de conduction survenant chez des patients ayant un cœur d'architecture normale. Les anomalies de la conduction sont généralement la conséquence de dysfonctionnements des canaux ioniques cardiaques ou des protéines qui leur sont associées. Ces dysfonctionnements peuvent être causés par des désordres électrolytiques ou des intoxications (médicaments ou toxines végétales), et sont alors le plus souvent réversibles. Dans d'autres cas, des formes familiales de troubles de conduction ont permis d'identifier une origine génétique à ces anomalies.

Cependant, il est important de se rappeler que les troubles de conduction observés peuvent être le premier signe d'une atteinte myocardique débutante, comme dans le cas des laminopathies, où le diagnostic des troubles de conduction précède le plus souvent la découverte de la cardiomyopathie chez les patients.

♦ Avec perte de fonction du canal sodique *SCN5A*

Selon Lenègre et Moreau (1963), dans plus de 50 % des blocs AV chroniques, aucune cardiopathie organique précise ne peut être identifiée, et ces cas sont considérés comme cliniquement primitifs. Le bloc AV chronique résulterait d'une dégénérescence fibreuse primitive frappant les voies de conduction intracardiaque et particulièrement les branches du faisceau de His. Très souvent, le bloc AV est précédé par un bloc de branche, ainsi il débiterait par la destruction d'une branche, souvent la droite, puis, lorsque la destruction de l'autre branche atteint un degré suffisant, le bloc s'installerait de façon intermittente. Les altérations des voies de conduction sont de nature presque toujours dégénératives, scléreuses ou scléro-dégénératives, d'évolution progressive et d'origine inconnue (Lenègre & Moreau, 1963 ; Lev, 1964 ; Lev *et al.*, 1970). Le bloc AV idiopathique causé par des lésions dégénératives des deux branches du faisceau de His est encore appelé la maladie de Lenègre.

Ces troubles de conduction isolés se développant progressivement sur plusieurs années jusqu'à l'apparition d'un bloc complet étaient considérés initialement comme une affection du sujet âgé, mais de nombreuses publications ont montré l'existence d'un facteur de prédisposition héréditaire dans de nombreuses familles, dans lesquelles plusieurs sujets sont atteints de troubles progressifs d'allure idiopathique (Morgans *et al.*, 1974 ; Greenspahn *et al.*, 1976).

Le gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité α des canaux sodiques humains est à ce jour le seul gène à avoir été identifié pour son implication dans les troubles de conduction isolés progressifs héréditaires. Récemment, notre laboratoire a mis en évidence l'implication de *SCN5A* dans des troubles de conduction progressifs familiaux caractérisés par une atteinte de l'ensemble du tissu de conduction (Schott *et al.*, 1999 ; Probst *et al.*, 2003). En effet, le séquençage du gène *SCN5A* a permis d'identifier la mutation IVS.22+2 T→C (Δ exon 22) dans une famille française, et la mutation 5280delG dans une famille hollandaise, toutes deux atteintes de trouble de conduction. La mutation *SCN5A* Δ exon 22 entraîne un épissage anormal de l'exon 22 et est particulièrement intéressante, car dans la famille française les troubles de conduction sont progressifs, ce qui est caractéristique de la maladie de Lenègre.

En effet, la durée des paramètres de conduction ECG : P, PR et QRS augmente avec l'âge chez tous les sujets porteurs de la mutation. Dans un système de réexpression hétérologue, cette protéine mutée ne génère pas de courant. Ces résultats suggèrent que chez les patients atteints, la réduction de 50% du courant sodique doit diminuer la vitesse de propagation de l'influx électrique et ainsi prolonger la durée des paramètres de conduction. La révélation tardive du phénotype observée dans la maladie de Lenègre associée à *SCN5A* pourrait être la double résultante de l'haploinsuffisance et d'anomalies dégénératives du tissu de conduction liées au vieillissement : chez ces patients ayant dès la naissance une réduction du courant sodique, la conduction se maintiendrait dans les limites de la normale jusqu'à ce qu'avec le vieillissement, le phénomène surajouté de fibrose du tissu de conduction déclenche l'apparition de troubles conductifs cliniquement patents (Probst *et al.*, 2003).

D'autres mutations de *SCN5A* associées à des troubles de conduction ont été identifiées par la suite. Ces mutations provoquent toutes une diminution du courant sodique cardiaque, qui peut répondre de plusieurs mécanismes :

- une haploinsuffisance. C'est le cas de la mutation Δ exon 22 qui entraîne une délétion de l'exon 22 avec une perte du segment DIIIS4 responsable de la sensibilité au potentiel du canal. La réexpression de la protéine tronquée dans des cellules COS-7 montre que cette protéine est normalement exprimée à la membrane, mais que le canal n'est pas fonctionnel (Probst *et al.*, 2003). C'est également le mécanisme de la perte de fonction pour la mutation G1408R (Kyndt *et al.*, 2001).

- un défaut d'adressage de la protéine. C'est le cas de la mutation 5280delG responsable d'un décalage de la phase de lecture dans la séquence codant pour la région pore du domaine IV et de la formation d'un codon stop prématuré. La protéine anormale qui en résulte n'atteint pas la membrane cellulaire (Herfst *et al.*, 2003).

- une modification des propriétés d'activation et/ou d'inactivation du canal. C'est le cas des mutations G514C (Tan *et al.*, 2001), D1595N, G298S (Wang *et al.*, 2002) et R225W (Bezzina *et al.*, 2003).

Des mutations du gène *SCN5A* ont également été mises en évidence dans d'autres pathologies cardiaques. Comme les mutations de *SCN5A* impliquées dans la maladie de Lenègre héréditaire, celles associées au syndrome de Brugada provoquent une perte de fonction du canal sodique alors que celles impliquées dans le syndrome du QT long de type 3 provoquent un gain de fonction (Napolitano *et al.*, 2003). Parmi les mutations connues de *SCN5A*, la mutation faux-sens G1408 R, peut dans une même famille, induire soit un phénotype de syndrome de Brugada, soit un phénotype de maladie de Lenègre, suggérant que des facteurs environnementaux ou génétiques, non encore identifiés, pourraient

moduler l'expression phénotypique d'une même mutation (Kyndt *et al.*, 2001). Des mutations de *SCN5A* peuvent aussi provoquer chez un même individu un syndrome de Brugada et un syndrome du QT long (Bezzina *et al.*, 1999), des troubles de conduction et un syndrome du QT long (Kehl *et al.*, 2004) ou des troubles de conduction, un syndrome de Brugada et un syndrome du QT long (Grant *et al.*, 2002). Des mutations de *SCN5A* ont également été décrites récemment dans des formes familiales de dysfonction sinusale (Smits *et al.*, 2005). Enfin des arythmies auriculaires peuvent aussi être observées dans certaines familles, en association avec des troubles de conduction et une cardiomyopathie dilatée (Olson *et al.*, 2005) ou seulement avec des troubles de conduction (Laitinen-Forsblom *et al.*, 2006).

Ainsi il apparaît que les mutations du gène *SCN5A* ont une expressivité variable, car les personnes porteuses d'une même mutation peuvent présenter des symptômes différents ou de degré variable. De plus, une même mutation peut conduire à un phénotype asymptomatique ou symptomatique, définissant la pénétrance incomplète des pathologies liées aux mutations du gène *SCN5A*.

Un modèle de souris a été réalisé par invalidation du gène *Scn5a* (Papadatos *et al.*, 2002). Les souris homozygotes *Scn5a*^{-/-} meurent à l'état embryonnaire (10.5 jours post-coïtum). Ces embryons homozygotes sont plus petits que les embryons sauvages et présentent des anomalies de développement des chambres et parois ventriculaires. Les cardiomyocytes de souris hétérozygotes *Scn5a*^{+/-} âgées de 8-10 semaines ont une réduction de 50% du courant sodique endogène. A l'ECG de surface, des défauts de conduction sont mis en évidence : bradycardie, durée de l'intervalle PR et de l'onde P prolongées sans allongement de la durée de l'intervalle QT (Papadatos *et al.*, 2002). Ce modèle de souris a une sensibilité augmentée aux arythmies ventriculaires déclenchées par stimulation programmée. Les caractéristiques électrocardiographiques et la susceptibilité aux arythmies de ces souris transgéniques sont semblables à celles qui sont observées chez les patients atteints de la maladie de Lenègre (Figure 26, page 72) et du syndrome de Brugada.

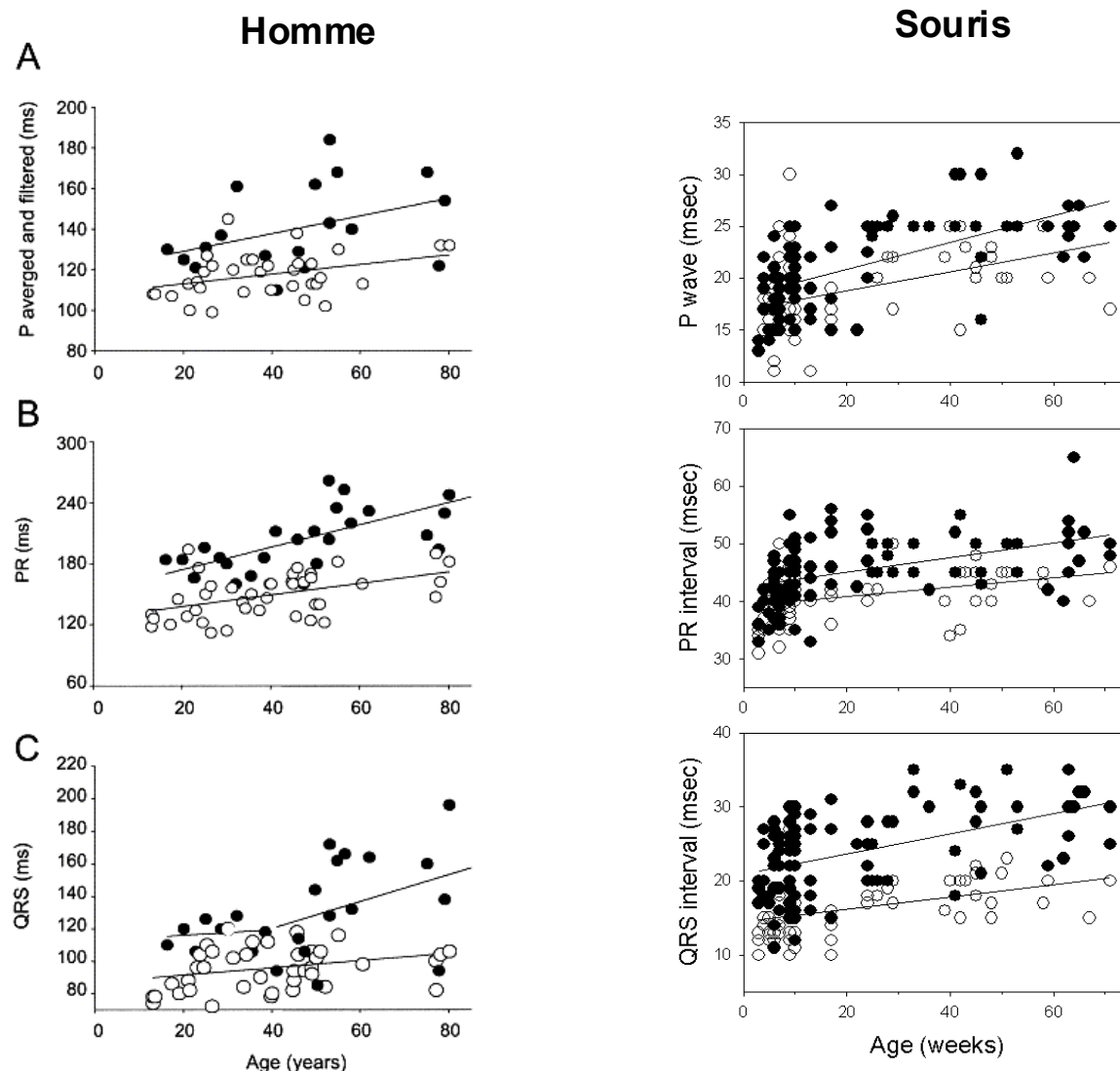


Figure 26 : Evolution des paramètres ECG avec l'âge chez les patients atteints de troubles de conduction progressifs mutés SCN5A et chez les souris *Scn5a*^{+/-}. Les ronds noirs correspondent aux patients ou souris avec perte de fonction du gène SCN5A. Les ronds blancs correspondent aux patients non mutés ou aux souris sauvages. D'après Probst *et al.*, 2003 et Royer *et al.*, 2005.

Nous reviendrons sur ce modèle dans la partie "Résultats" de ce travail, car il nous a permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques conduisant d'une perte d'un allèle du gène *Scn5a* à la survenue de troubles de conduction progressifs. Ce modèle récapitulant le phénotype des patients atteints de la maladie de Lenègre nous a, par ailleurs, permis d'étudier l'hétérogénéité phénotypique observée dans cette pathologie.

◆ Avec perte de fonction des canaux calciques

Des formes autoimmunes de troubles de conduction AV existent. Dans les modèles murins de dysfonction sinusale, nous avons présenté les modèles de souris reproduisant les anomalies sinusales et de conduction AV observés chez les nouveaux-nés de mères atteintes de maladies autoimmunes. Le bloc est de siège nodal et le degré est variable. Chez l'homme, lorsqu'il n'est pas complet d'emblée, une régression complète peut être observée. Le mécanisme fait appel au passage transplacentaire d'auto-anticorps maternels IgG anti-Ro/SS-A et/ou anti-LA/SS-B (Scott *et al.*, 1983). Les anticorps maternels auraient pour cible le canal calcique de type L des cardiomyocytes du nœud AV fœtal ; il résulterait de cette interaction une diminution du courant calcique $I_{Ca,L}$ (Qu *et al.*, 2005). Une diminution du courant $I_{Ca,T}$ a également été montrée (Hu *et al.*, 2004).

Des troubles de conduction AV sévères ont été mis en évidence chez des souris invalidées pour la sous-unité α_{1D} du canal calcique de type L, $Ca_v1.3$. Des blocs AV du premier et deuxième degré existent chez les animaux vigiles ou anesthésiés, ainsi que lorsque les cœurs sont montés en Langendorff (Platzer *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Matthes *et al.*, 2004). Le siège de ces blocs est suprahissien comme en atteste l'allongement de l'intervalle AH et non de l'intervalle HV (données non publiées du laboratoire).

◆ Avec perte de fonction des connexines

Comme nous l'avons évoqué dans la partie sur les dysfonctions sinusales, deux polymorphismes dans le gène codant pour la connexine 40, exprimée majoritairement dans l'oreillette, ont été retrouvés à l'état homozygote dans une forme familiale de dysfonction sinusale et de troubles de conduction infra-hissiens. Ces patients avaient en outre une mutation sur le gène *SCN5A* responsable d'une réduction du courant sodique (Groenewegen *et al.*, 2003).

Les rôles prépondérants de la Cx43 dans la conduction ventriculaire, et de la Cx40 dans la conduction auriculo-ventriculaire, ont été confirmés dans plusieurs modèles transgéniques murins (Gros *et al.*, 2004). La délétion complète du gène codant pour la connexine 43 est létale chez la souris liée à des anomalies du développement cardiaque. Les souris $Cx43^{+/-}$ présentent un ralentissement de la conduction ventriculaire tandis que leur conduction atriale n'est pas modifiée (Thomas *et al.*, 1998). De plus, les souris invalidées de façon conditionnelle pour la Cx43 (souris $Cx43^{Cre-ER(T)/fl}$) présentent un ralentissement de la conduction ventriculaire, une augmentation de l'anisotropie (ratio : conduction

longitudinale/conduction transversale) et une plus forte susceptibilité aux tachyarythmies ventriculaires (van Rijen *et al.*, 2004). Enfin, les souris Cx40^{-/-} présentent des blocs AV, des blocs de branches et une plus grande susceptibilité aux tachycardies atriales spontanées ou induites (Vanderbrink *et al.*, 2000 ; Simon *et al.*, 1998 ; Kirchoff *et al.*, 2000 ; Bevilacqua *et al.*, 2000 ; Tamaddon *et al.*, 2000). La diminution du rythme cardiaque, l'augmentation de sa variabilité, ainsi que les défauts de conduction sino-atriale suggèrent par ailleurs son rôle dans le nœud sinusal chez la souris (Bevilacqua *et al.*, 2000 ; Hagendorff *et al.*, 1999).

Malgré son expression globalement plus faible que les autres connexines, la Cx45 est spécifiquement exprimée dans le système de conduction ventriculaire (Coppen *et al.*, 1998). L'inactivation des deux allèles de la Cx 45 est létale chez la souris. Des anomalies morphologiques cardiaques associées à un bloc de conduction AV et un asynchronisme de la contraction ventriculaire ont été mises en évidence chez les embryons (Kumai *et al.*, 2000 ; Nishii *et al.*, 2003).

La déphosphorylation des connexines peut aussi être responsable de troubles de la conduction AV. Dans un modèle de souris surexprimant un facteur de transcription activé lors de stimulation adrénergique, RTEF-1 (transcription enhancer factor-1-related factor), la conduction AV et ventriculaire est allongée et des arrhythmies supra-ventriculaires et ventriculaires spontanées ont été enregistrées. La surexpression de ce facteur induit une augmentation de la protéine phosphatase 1 β dans le cœur, responsable de la déphosphorylation des connexines 40 et 43. Aucune diminution de l'expression de ces mêmes connexines n'a été mise en évidence (Chen *et al.*, 2004). Cette étude constitue la première démonstration *in vivo* de survenue de troubles du rythme et de la conduction lors de déphosphorylation chronique des connexines.

Dans d'autres cas familiaux de troubles de conduction, les gènes impliqués restent à identifier. Lorsque l'inactivation d'un gène non identifié en clinique entraîne des troubles de conduction dans un modèle murin, ce gène peut devenir un nouveau candidat à screener chez les patients. C'est par exemple le cas de l'inactivation du facteur de transcription HF-1b qui entraîne chez la souris des morts subites liées à des troubles de conduction et des tachycardies ventriculaires spontanées (Nguyen-Tran *et al.*, 2000). Ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules ventriculaires et du système de conduction (St Amand *et al.*, 2003).

De même des souris surexprimant une carboxypeptidase (ACE2), proche de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, présentent des troubles de la conduction AV sévères associées à des épisodes de tachycardie ventriculaire rapidement létaux. Une

diminution des connexines 40 et 43 a été mise en évidence dans le cœur de ces souris pouvant rendre compte des anomalies rythmiques observées (Donoghue *et al.*, 2003).

Parmi les modèles murins présentés, certains sont directement reliables à des pathologies rythmiques connues chez l'homme, tandis que d'autres ne le sont pas encore. Les gènes modifiés dans ces derniers modèles pourraient constituer de nouveaux gènes candidats sur lesquels rechercher des mutations lors de formes familiales de dysfonction sinusale ou de troubles de conduction auriculo-ventriculaire.

III. MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE L'AUTOMATISME ET DE LA CONDUCTION CARDIAQUE

Dans ce chapitre vont être présentées les classes de médicaments capables de moduler l'automatisme et la conduction de l'influx électrique dans le cœur. Nous aborderons essentiellement les antagonistes des canaux et échangeurs ioniques.

A. Inhibiteurs des canaux HCN

Le courant I_f généré par les canaux HCN est connu pour jouer un rôle prépondérant dans le déclenchement de la dépolarisation diastolique des cellules *pacemaker*. Par conséquent, ce courant constitue une cible pharmacologique de choix, lorsqu'un ralentissement de la fréquence cardiaque est recherché. Une diminution de la fréquence cardiaque est par exemple salutaire dans plusieurs pathologies ischémiques, comme l'angor stable, le syndrome coronarien aigu ou l'insuffisance cardiaque. Elle permet, en effet, de limiter la demande métabolique du myocarde et d'augmenter la perfusion myocardique.

Depuis quelques années, de nouveaux agents bradycardisants qui ont pour cible prioritaire les canaux HCN ont été décrits. Les principales molécules sont la zatébradine ou UL-FS 49, l'ivabradine ou S 16257 et le ZD 7288 (DiFrancesco, 2005 ; Bosmith *et al.*, 1993). L'inhibition du courant I_f ralentit la fréquence cardiaque en diminuant la pente de dépolarisation diastolique sans altérer les autres paramètres du potentiel d'action (Figure 27, page 76). Des études précliniques et cliniques ont démontré l'absence d'effet de l'ivabradine

sur la contractilité myocardique, la conduction AV et la repolarisation ventriculaire (Vilaine, 2006).

Des études électrophysiologiques réalisées sur des cellules isolées du nœud sinusal et du tissu de Purkinje montrent que ces composés ont un mode d'action différent de celui des neuromédiateurs. En effet, ils diminuent la conductance globale sans déplacer le seuil d'activation des canaux. Le blocage induit par la zatébradine ou l'ivabradine est dépendant de la fréquence de stimulation (DiFrancesco, 2006).

Le site de fixation de ces agents serait localisé à l'intérieur du canal par un accès du côté cytosolique. La spécificité de ces molécules vis-à-vis des canaux HCN est relativement importante. En effet, à des concentrations thérapeutiques, aucune action significative n'est observée sur les canaux calciques (de type L et T) ou sur les canaux potassiques. Cette nouvelle classe de molécules bradycardisantes dépourvues d'effets inotrope et dromotrope est particulièrement bien adaptée dans le traitement des ischémies cardiaques.

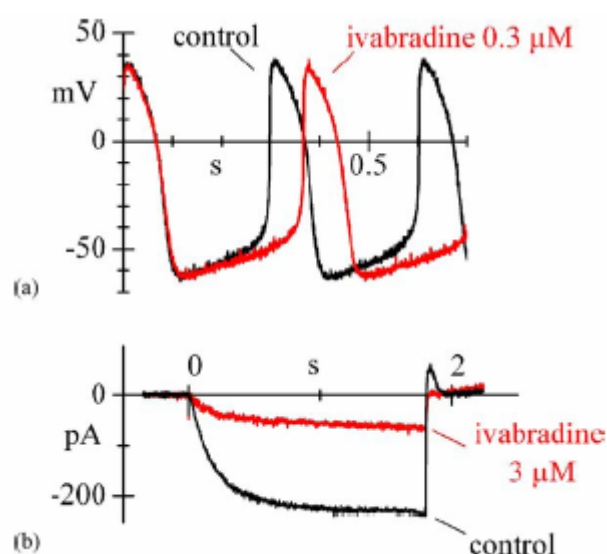


Figure 27 : Blocage des canaux HCN par l'ivabradine. (a) L'ivabradine ralentit l'activité spontanée des cellules sinusales en réduisant spécifiquement la pente de dépolarisation diastolique. (b) Inhibition du courant I_f enregistré par la technique de patch-clamp. Expériences réalisées sur des cellules sinusales de lapin. D'après Bucchi *et al.*, 2002.

B.

Inhibiteurs des canaux sodiques

Les inhibiteurs des canaux sodiques appartiennent à la première classe des anti-arythmiques selon la classification de Vaughan-Williams. Cette classification a été faite selon les effets des différents anti-arythmiques sur les potentiels d'action cardiaques (Vaughan Williams, 1970).

Les antiarythmiques de la classe I diminuent la vitesse maximale de dépolarisation ($V_{\max}$ = pic de la dérivée première de la phase 0 du PA) des cellules à conduction rapide (oreillettes, faisceau de His et ses branches, réseau de Purkinje et ventricules) par inhibition du courant sodique rapide, I_{Na} (Kohlhardt *et al.*, 1989). Il en résulte un ralentissement de la vitesse de conduction au sein de ces structures. L'amplitude de cet effet et l'existence d'autres propriétés expliquent la répartition des antiarythmiques de la classe I en trois sous-classes dites Ia, Ib et Ic (tableau1).

Classe Ia (quinidine, procainamide, disopyramide, ajmaline)	Classe Ib (lidocaïne, mexilétine, tocainide, diphénylhydantoïne)	Classe Ic (flécaïnide, propafénone, cibenzoline et nadoxolol)
➤ Baisse moyenne de la $V_{\max}$ ➤ Allongement de durée du PA ➤ Allongement de la PRE ➤ Augmentation QRS et QT	➤ Baisse discrète de la $V_{\max}$ ➤ Raccourcissement de durée du PA et de PRE ➤ QRS et QT non modifiés	➤ Baisse marquée de la $V_{\max}$ ➤ Durée du PA et PRE peu modifiées ➤ Augmentation du QRS, QT non modifié

Tableau 1 : Effets des antiarythmiques de classe I de la classification de Vaughan-Williams.
PA, potentiel d'action ; PRE, période réfractaire effective.

Schématiquement, les antiarythmiques de la classe Ia ont un pouvoir vagolytique par blocage des récepteurs muscariniques (quinidine, disopyramide). Le procainamide augmente le temps de conduction du nœud AV par effet inhibiteur calcique. Tous allongent la durée du potentiel d'action membranaire et, par conséquent, la repolarisation des cardiomyocytes, ce qui contribue à leur pouvoir antiarythmique, mais aussi proarythmogène (Roden *et al.*, 1988 ; Echt *et al.*, 1989). Par ailleurs, ils dépriment la contractilité, et entraînent une vasodilatation par blocage des récepteurs α -adrénergiques vasculaires, à l'exception du disopyramide. Contrairement aux agents de la classe Ia, ceux de la classe Ib, accélèrent la repolarisation et raccourcissent la durée du potentiel d'action, tandis que ceux de la classe Ic modifient peu la repolarisation. La période réfractaire n'est pas ou peu modifiée en moyenne.

Chez la souris, la lidocaïne induit un allongement dose dépendant de la durée des intervalles PP, PR, et de l'onde P (Lande *et al.*, 2001).

L'efficacité antiarythmique dépend également de la cinétique de fixation et de libération de l'antiarythmique des récepteurs du canal sodique. Celle-ci est fonction de l'état des canaux sodiques et de la fréquence cardiaque. La quinidine et le flecainide (et les agents de leurs groupes respectifs) se fixent préférentiellement sur les canaux dans leur état activé alors que la lidocaïne se fixe surtout lorsque les canaux sont inactivés (Clarkson *et al.*, 1988 ; Nitta *et al.*, 1992). De plus, la rapidité de fixation et de libération du récepteur varie en fonction du sous-groupe considéré (Hondeghe & Katzung, 1984). La cinétique est rapide pour les substances de la classe Ib, lente pour la classe Ic, et intermédiaire pour la classe Ia (Hondeghe & Katzung, 1977 ; Clarkson & Hondeghe, 1985). Ainsi, en cas de fréquence cardiaque élevée ou de dépolarisation cellulaire, les antiarythmiques saturant plus de récepteurs et dépriment plus volontiers la Vmax, d'autant plus s'ils appartiennent à la classe Ic. Ce phénomène est connu sous le terme de use-dépendance ou de fréquence-dépendance.

Les inconvénients communs des produits de la classe I sont leurs effets arythmogènes et leur inotropisme négatif. Certains anti-arythmiques de classe I ont par ailleurs des propriétés annexes ; des propriétés anti cholinergiques pour le disopyramide ou β -bloquantes pour le propafénone. Les effets secondaires rencontrés le plus souvent sont d'origine gastrointestinale ou nerveuse comprenant nausée, vomissements, tremblements, ataxie, confusion et perte de mémoire.

C. Inhibiteurs des canaux potassiques

Les inhibiteurs des canaux potassiques appartiennent à la troisième classe des anti-arythmiques selon la classification de Vaughan-Williams. Les antiarythmiques de classe III sont indiqués aussi bien lors d'arythmie auriculaire que d'arythmie ventriculaire. Les antiarythmiques de cette classe prolongent la repolarisation du myocarde auriculaire et à un moindre degré ventriculaire (Baskin & Lynch, 1998). Cet effet porte le plus souvent sur le courant potassique rapide (I_{Kr}). Cependant, les antiarythmiques de la classe III peuvent également inhiber d'autres courants potassiques.

La diminution des courants K^+ a deux effets : l'allongement de la durée de l'intervalle QT, et par voie de conséquence une augmentation de la dispersion de l'intervalle QT, tous deux constituant des facteurs arythmogènes. Cette activité pro-arythmique des agents de classe III a été mise en évidence pour la première fois en 1995 lors de l'étude SWORD

(survival with oral d-sotalol). Cette étude clinique qui portait sur les effets du d-sotalol chez des patients en post-infarctus s'est révélée alarmante (Waldo *et al.*, 1996). En effet, le taux de mortalité chez les patients traités au d-sotalol était supérieur à celui du groupe placebo. En conséquence, l'essai clinique a été arrêté. Les résultats de cette étude ont eu un impact sur le développement de nouvelles molécules antiarythmiques. Par la suite, l'accent a été mis sur des composés avec des profils pharmacologiques plus complexes ayant des cibles multiples afin de limiter d'éventuels effets proarythmiques. C'est le cas de l'amiodarone qui peut agir sur plusieurs canaux ioniques (sodique, calcique et potassique) et qui a des effets à court terme et chroniques différents (Kodama *et al.*, 1997). L'amiodarone est actuellement l'antiarythmique le plus efficace et le plus utilisé dans le traitement d'arythmies ventriculaires et de la fibrillation auriculaire. Ses effets bénéfiques ont été démontrés par plusieurs études cliniques (EMIAT, CAMIAT, CASCADE).

Sotalol

L'activité antiarythmique du sotalol en pratique clinique est principalement liée à une prolongation de la période réfractaire par inhibition du courant potassique. En effet, si cet agent possède un pouvoir β -bloquant, et à forte concentration un pouvoir inhibiteur calcique lui permettant de ralentir la fréquence sinusale et la conduction du nœud AV, son isomère dextrogyre, le d-sotalol, en est quasiment dépourvu (Komeichi *et al.*, 1990). Pourtant, les deux isomères induisent le même degré de prolongation de la repolarisation des myocytes auriculaires, ventriculaires, des cellules du système His-Purkinje et de celles des faisceaux accessoires. L'effet du sotalol semble s'exercer uniquement sur les courants I_{Ks} et I_{Kr} , sans interférence avec les courants I_{K1} et I_{Na} . Cependant, le sotalol inhibe préférentiellement le courant I_{Kr} par rapport au courant I_{Ks} (Wettwer *et al.*, 1992), ce qui explique son potentiel proarythmique. Des interférences avec les agents bradycardisants et avec ceux qui prolongent la repolarisation sont donc à envisager.

Amiodarone

Si les effets électrophysiologiques de l'amiodarone sont complexes, son appartenance à la classe III tient à sa capacité à inhiber les courants potassiques. Cependant, l'amiodarone module également d'autres canaux ioniques et récepteurs membranaires (Freedman & Somberg, 1991), plus ou moins nombreux selon que l'administration est aiguë ou chronique. En administration aiguë, l'amiodarone inhibe les courants I_{Kr} et I_{Ks} , I_{KAch} (Haworth *et al.*, 1989), $I_{K,Na}$ (Mori *et al.*, 1996) et à forte concentration I_{K1} (Bertran *et al.*, 1998). Elle inhibe également les courants I_{Na} (Honjo *et al.*, 1991) et I_{Ca} (Nattel *et al.*, 1987 ; Valenzuela *et al.*, 1991), principalement à forte concentration. Ces effets

ioniques sont susceptibles d'entraîner une prolongation de la repolarisation, une diminution de l'excitabilité et un ralentissement de la conduction au niveau des différentes structures du tissu cardiaque. En fait, en pratique clinique, l'administration d'amiodarone par voie intraveineuse s'accompagne d'une modification minime des périodes réfractaires de l'oreillette, du système His-Purkinje et du myocarde ventriculaire. À l'inverse, il existe un ralentissement de la fréquence sinusale (Sato, 1991) et de la conduction du nœud AV, et un allongement de la période réfractaire effective du nœud AV et des faisceaux accessoires (Spinelli & Hoffman, 1989).

L'administration chronique d'amiodarone conduit à une prolongation modérée de la repolarisation par inhibition des courants I_{Kr} , I_{Ks} et I_{to} . L'accumulation d'amiodarone dans les tissus cardiaques entraîne des effets classe I, classe II (β -bloquant) et classe IV, ralentissant la conduction tant au niveau du myocarde que du nœud AV. De plus, les effets chroniques de cette molécule passent par son interférence avec le métabolisme des hormones thyroïdiennes (Toft & Boon, 2000), conduisant à un tableau clinique d'hypothyroïdie favorisant la bradycardie et l'allongement de la repolarisation.

Autres antiarythmiques de classe III

L'ibutilide inhibe de manière préférentielle le courant I_{Kr} (Yang *et al.*, 1995). Parallèlement, il active un courant sodique lent entrant à travers les canaux calciques de type L pendant les phases de dépolarisation et de plateau (Lee & Lee, 1998). Ces deux actions concourent à son pouvoir antiarythmique.

Contrairement aux autres agents de classe III, le dofétilide est un inhibiteur sélectif du courant I_{Kr} (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993). Il induit une prolongation de la repolarisation des myocytes auriculaires et ventriculaires, d'autant plus importante que la fréquence cardiaque est élevée.

D'autres molécules sont en cours de développement et d'évaluation. Il en est ainsi de l'azimilide qui prolonge la repolarisation en bloquant les courants I_{Kr} et I_{Ks} (Nattel *et al.*, 1998). La dronédarone possède les effets des 4 classes d'antiarythmiques et se comporte donc comme l'amiodarone (Manning *et al.*, 1995). Contrairement à celui-ci, il n'interfère pas avec les hormones thyroïdiennes. Enfin, le tédisamil aussi en cours de développement clinique prolonge la repolarisation en bloquant principalement les courants I_{to} et I_{Kr} (Jost *et al.*, 2004).

Chez la souris, le dofétilide induit une bradycardie dose dépendante, sans altérer la conduction AV et la repolarisation ventriculaire. Le tédisamil par contre, prolonge à la fois la repolarisation et la durée de l'intervalle PP, reflet du rythme sinusal (Lande *et al.*, 2001).

D. Inhibiteurs des canaux calciques

Les inhibiteurs des canaux calciques appartiennent à la quatrième classe des antiarythmiques selon la classification de Vaughan-Williams. Les inhibiteurs utilisés comme antiarythmiques appartiennent à deux groupes structurellement bien distincts : les phénylalkylamines (vérapamil, bépridil), et les benzothiazépines (diltiazem).

Ces antiarythmiques bloquent les canaux calciques de type L de manière potentiel- et fréquence-dépendante, en fonction de leur état fonctionnel (Karraya *et al.*, 1983). Ainsi, ils diminuent la V_{max} de la phase 0 et la pente de dépolarisation diastolique spontanée des potentiels d'action lents (Noma *et al.*, 1980). Il en résulte une dépression dépendante de la fréquence de l'influx sinusal et de la conduction antérograde du nœud AV (Talajic *et al.*, 1989 ; Talajic *et al.*, 1990). En outre, le diltiazem raccourcit le plateau du PA (phase 2) des structures à réponse rapide (oreillettes, His, Purkinje et ventricules), auquel il confère un aspect triangulaire. Cependant, il ne modifie pas la vitesse de conduction de ces tissus. Il est donc théoriquement sans action antiarythmique auriculaire et ventriculaire, sauf lorsque les cellules sont partiellement dépolarisées et/ou ischémiques (Singh *et al.*, 1987 ; Curtis *et al.*, 1986). Le bépridil inhibe autant le courant calcique que le courant sodique rapide, ce qui lui confère des propriétés classe la autant sur le plan antiarythmique que proarythmogène (Labrid *et al.*, 1979). Il allonge donc la conduction sino-auriculaire, la repolarisation et les périodes réfractaires ventriculaires sans modifier l'intervalle HV ou le QRS (Sassine *et al.*, 1984). Ainsi, il pourrait être efficace sur les troubles du rythme ventriculaires (Winslow *et al.*, 1983). Enfin, les inhibiteurs calciques diminuent les résistances vasculaires systémiques, la pression artérielle et la contractilité. Leur effet inotrope négatif est moins marqué pour le diltiazem.

Les inhibiteurs calciques sont particulièrement efficaces dans la réduction des tachycardies jonctionnelles (Huycke *et al.*, 1989). Ils réduisent les tachycardies atriales et ralentissent la cadence ventriculaire en ralentissant la conduction au niveau du nœud AV (Salerno *et al.*, 1989). Ils sont un traitement de choix pour les tachycardies supraventriculaires par réentrée. Cependant ils peuvent induire une bradycardie sinusale, ou un bloc AV.

E. β -bloquants

Les β -bloquants sont des antiarythmiques de classe II selon la classification de Vaughan-Williams. Ils bloquent de manière compétitive les récepteurs β -adrénergiques et

s'opposent ainsi aux effets de la stimulation adrénergique sur les canaux HCN, calciques et potassiques. Il s'ensuit une diminution de la pente de dépolarisation diastolique lente spontanée des cellules nodales responsable d'une bradycardie sinusale d'autant plus importante que le niveau de tonus sympathique préexistant est élevé. Les β -bloquants ralentissent la conduction au niveau de l'oreillette et du nœud AV, et allongent la période réfractaire effective des cellules nodales, avec un bénéfice principalement au niveau du nœud AV (Zicha *et al.*, 2006). Ils sont largement utilisés seuls ou en association avec d'autres antiarythmiques, dans la prévention de la mort subite après infarctus du myocarde (Norris *et al.*, 1984).

Classes	Exemples	Sites d'action	Mécanismes d'action	Indications
Ia	Quinidine, Procainamide, Disopyramide	HP, A, V	Ralentit Vmax Allonge modérément la repolarisation, les durées des intervalles PR et QRS	TSV, TV
Ib	Lidocaïne, Mexilétine	V	Effet limité sur Vmax Raccourcit la repolarisation	TV, FV
Ic	Flecaïnide, Propafenone	HP, V	Ralentit Vmax Peu d'effet sur la repolarisation Allongement prononcé de durées de PR et QRS	TSV, TV
II	Propranolol, esmolol	Nœud sinusal, nœud AV	Ralentit dépolarisation spontanée en phase 4 du PA, dans nœud sinusal et nœud AV. Supprime augmentation catécholaminergique des courants I_f , I_K , $I_{Ca,L}$ et I_{st} .	Tachyarythmies
III	Sotalol, Amiodarone	A, V, nœud AV, nœud sinusal, HP, F access	Allongement durée PA Réduction automatisme du nœud sinusal et du nœud AV	FA, Flutter A, TSV, TV, Tachycardies nodales, Prévention FV
IV	Verapamil, Diltiazem	Nœud AV	Depression Phases 2 et 3 du PA	Tachyarythmies A

Tableau 2 : Effets des antiarythmiques des 4 classes de la classification de Vaughan-Williams. HP, système His-Purkinje ; A, oreillette ; V, ventricule ; Nœud AV, nœud auriculo-ventriculaire ; F access, faisceaux accessoires ; PA, potentiel d'action ; TSV, tachycardie supra-ventriculaire ; TV, tachycardie ventriculaire ; FA, fibrillation auriculaire ; FV, fibrillation ventriculaire. D'après Hancox *et al.*, 2000.

F.

Digitaliques

Connus et utilisés depuis très longtemps, les digitaliques (glucosides cardiotoniques) sont des substances d'origine naturelle contenues dans diverses plantes (digitale, scille). Bien qu'étant très utilisés, les digitaliques n'entrent dans aucune des catégories de la classification de Vaughan-Williams. Ils sont prescrits dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, surtout associée à une fibrillation auriculaire avec tachycardie.

Les effets principaux des digitaliques sont une diminution de la fréquence sinusale, des périodes réfractaires auriculaires, et de la conduction intra-auriculaire. Ils ont un effet inotrope positif par inhibition de la Na/K ATPase, ce qui aboutit à une augmentation de la quantité de calcium libérée par le réticulum sarcoplasmique lors de chaque cycle de contraction. L'inhibition de la Na/K ATPase empêche en effet la sortie des ions Na^+ hors de la cellule, ce qui freine le système d'échange Na/Ca trans-membranaire et aboutit à une moindre sortie de calcium et donc à une surcharge calcique intra-cellulaire. Lorsque le niveau d'inhibition de l'ATPase est important, les capacités de stockage en calcium du réticulum sarcoplasmique sont débordées, le calcium s'accumule dans le cytosol. Le seuil de toxicité est alors atteint avec induction d'arythmies cardiaques par surcharge calcique intracellulaire (Wasserstrom & Aistrup, 2005). Les concentrations purement inotropes sont ainsi très proches des concentrations toxiques. Les digitaliques font partie des médicaments à marge thérapeutique étroite. A côté de ces effets cardiaques directs, l'inhibition par les digitaliques de la Na/K ATPase au niveau des cellules des baro-récepteurs aortiques et carotidiens les sensibilise à la pression artérielle, d'où une plus grande stimulation pour un même niveau de pression artérielle aboutissant à une inhibition du tonus sympathique et une augmentation du tonus vagal. Ces effets se traduisent par un ralentissement de la fréquence cardiaque et de la conduction AV.

Les effets secondaires de ces antiarythmiques découlent de la toxicité digitalique au niveau des tissus cardiaques (bradycardie sinusale, extrasystoles, tachycardies auriculaires ou ventriculaires, troubles de conduction AV) et digestif (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée).

A ce jour, aucune molécule connue pour moduler le fonctionnement des jonctions communicantes n'est approuvée en tant que traitement antiarythmique. Toutefois, l'utilisation de molécules capables d'augmenter ou de diminuer le couplage intercellulaire pourrait avoir un intérêt dans le traitement des arythmies par réentrées (de Groot *et al.*, 2003 ; Salameh & Dhein, 2005). Une seule étude préclinique *in vivo* apporte à ce jour des arguments

prometteurs pour l'utilisation potentielle de telles molécules dans le traitement de la fibrillation auriculaire. L'administration aiguë de rotigaptide (ZP123), qui améliore la conductance des jonctions communicantes sans altérer le fonctionnement des canaux ioniques, diminue la susceptibilité à la fibrillation auriculaire dans un modèle de régurgitation mitrale chez le chien (Eloff *et al.*, 2003 ; Guerra *et al.*, 2006). De plus, le rotigaptide augmente la vitesse de conduction et diminue l'hétérogénéité de la conduction dans l'oreillette gauche dans ce modèle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. ELECTROCARDIOGRAMME DE SURFACE

Chez l'homme, l'électrocardiogramme est composé de 12 dérivations distinctes parmi lesquelles il y a 6 dérivations des membres nommées D1, D2, D3, aVR, aVL et aVF. Chez l'animal anesthésié, nous avons enregistré une ou 6 dérivations de l'ECG, tandis que chez l'animal vigile nous avons enregistré la dérivation D2.

A. Chez la souris anesthésiée

Les souris sont anesthésiées grâce à une injection intrapéritonéale (IP) d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A.)

Les animaux sont en suite placés dans une cage de Faraday sur le dos sur un tapis chauffant avec une sonde rectale pour contrôler et maintenir leur température corporelle à un niveau physiologique. Pour obtenir 6 dérivations, quatre électrodes sous-cutanées de calibre 25 G sont placées à chacun des membres antérieurs et postérieurs de la souris. Lorsque seule la dérivation D1 est enregistrée seulement deux électrodes sont utilisées, une au niveau de chacun des membres antérieurs. Les ECG des différentes dérivations sont filtrés entre 0.5 et 250 Hz et enregistrés sur un ordinateur via un convertisseur analogique-numérique (IOX 1.585, EMKA Technologies, Paris, France).

Un premier enregistrement de base est réalisé quelques minutes après l'anesthésie. Le système nerveux autonome est ensuite bloqué par injection intra-péritonéale d'atropine, antagoniste du système parasympathique, à la dose de 0,5 mg/kg (Atropine 0,5 mg/ml, Lab. Aguettant) et de propranolol, antagoniste du système sympathique, à la dose de 1 mg/kg (Avlocardyl® I.V. 5 mg/ml, AstraZeneca). Le blocage du système nerveux autonome permet de normaliser la fréquence cardiaque de la souris et d'obtenir des fréquences cardiaques comparables d'un animal à un autre. En effet, de grandes variations inter-individuelles de la fréquence cardiaque existent dues à une balance sympatho-vagale propre à chaque animal. Dix minutes après blocage du système nerveux autonome, un deuxième enregistrement est réalisé. Un agent pharmacologique peut ensuite être injecté à la souris, et un troisième enregistrement sera effectué généralement 10 min après injection de celui-ci pour évaluer son effet.

Les enregistrements sont analysés grâce au logiciel ECG auto 1.5.12.10 (EMKA technologies, Paris, France). Toutes les mesures sont moyennées sur 3 complexes PQRST consécutifs en dérivation 1. Les paramètres mesurés en milli-seconde (ms) sont la durée de l'onde P, de l'intervalle PR, la durée du complexe QRS, de l'intervalle QT et de l'intervalle RR (Figure 28).

Pour le projet sur l'hétérogénéité phénotypique chez les souris *Scn5a^{+/-}*, les mesures des intervalles ont été réalisées sur les 6 dérivations simultanées. Le début et la fin de chaque onde étaient déterminés respectivement comme le point le plus précoce, et le point le plus tardif de chacune des ondes sur l'une des 6 dérivations. Les mesures étaient répétées sur 3 complexes successifs et moyennées.

Mesure du complexe QRS

Le 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.

Mesure de l'intervalle QT

L'intervalle QT est mesuré du début du complexe QRS à la fin de l'onde T. La durée de l'intervalle QT est corrigée en fonction du rythme sinusal par la formule :

$$QTc = QT / (RR / 100)^{1/2} \quad (\text{Mitchell et al., 1998}).$$

Cette formule permet de normaliser la mesure de l'intervalle QT pour un cycle de 100 ms (rythme physiologique moyen pour la souris). Les intervalles QT et RR sont exprimés en ms.

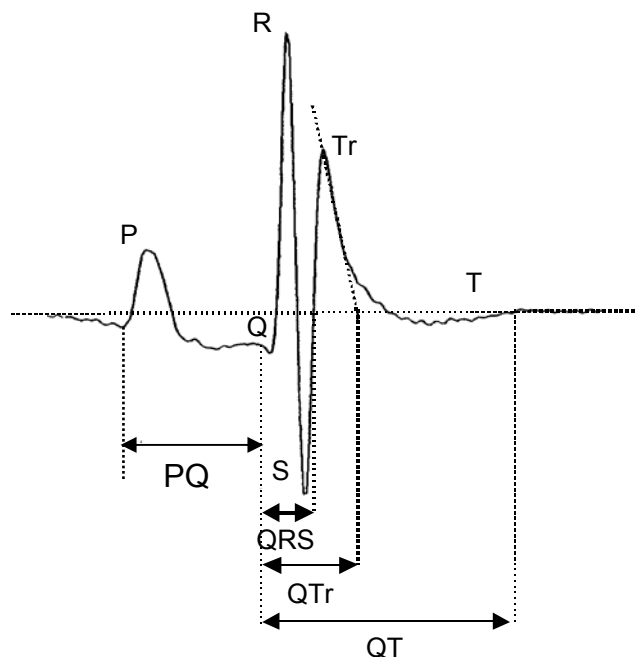


Figure 28 : Electrocardiogramme murin en D1

Ce type d'enregistrement peut être réalisé à partir de l'âge de 3 jours et jusqu'à la fin de la vie de l'animal.

B. Chez la souris vigile

Un enregistrement ECG en dérivation D2 est obtenu chez la souris vigile grâce à l'implantation chirurgicale préalable de deux électrodes reliées à un capteur de télémétrie (TA10EA-F20, Data Sciences International). Les animaux utilisés ont atteint l'âge adulte (>10 semaines) et doivent peser plus de 20g.

Une anesthésie générale par voie intrapéritonéale (étomidate 45 mg/kg) ou gazeuse (isoflurane 1.5%, Forène®, Abbott) est réalisée. Une anesthésie locale de chacun des points d'incision est obtenu par infiltration locale de lidocaïne 1% sous un volume de 50 à 100 µl. Les deux électrodes sont placées en sous-cutané et suturées au plan musculaire sur le thorax de façon à obtenir une dérivation D2. Le capteur de télémétrie est inséré dans une poche sous-cutanée au niveau du flanc gauche. Les souris sont hébergées dans des cages individuelles dans une animalerie à température contrôlée avec des cycles jour/nuit de 12 h. Cinq jours minimum après l'implantation, les signaux ECG sont enregistrés en continu pendant 24h par l'intermédiaire d'un récepteur de télémétrie couplé au système d'acquisition et de conversion des données ART 2.3 Gold (Data Sciences International).

Des administrations pharmacologiques peuvent être réalisées chez l'animal vigile, soit par injection intrapéritonéale, soit par sondage gastrique. C'est cette dernière voie que nous avons utilisée pour administrer l'ivabradine, un bloqueur des canaux HCN, à la dose de 5 mg/kg, deux fois par jour pendant 3 semaines, à des souris C57BL6.

Les paramètres ECG sont mesurés selon les critères utilisés chez la souris anesthésiée. Dans le cas d'une administration pharmacologique, la durée des intervalles est mesurée à des temps prédéfinis afin de suivre l'effet de la molécule administrée.

Les données récoltées en télémétrie, nous permettent également de mesurer d'autres paramètres, comme la durée de l'intervalle RR moyen sur 24h, sur la période de jour ou encore sur la période de nuit. Les intervalles RR minimum et maximum peuvent aussi être mesurés. Lorsque le rythme est sinusal, ces paramètres permettent d'évaluer le fonctionnement du nœud sinusal. L'enregistrement continu nous permet par ailleurs d'évaluer les variations nycthémérales de la fréquence cardiaque.

Enfin, l'obtention d'enregistrements continus de l'ECG chez la souris vigile permet d'évaluer l'équilibre sympatho-vagal responsable des variations battement à battement de l'intervalle RR. Le principal outil permettant d'étudier les variations de rythme cardiaque liées

à la régulation par le système nerveux autonome est l'analyse de la variabilité sinusale ("Heart Rate Variability" ou HRV en anglais) sur des enregistrements ECG en continu. L'analyse de la variabilité sinusale peut être effectuée dans le domaine temporel (analyse des intervalles R-R et de leur déviation standard) ou dans le domaine fréquentiel (étude de la puissance spectrale après transformée rapide de Fourier). L'analyse temporelle offre un reflet global de la balance vago-sympathique et s'applique essentiellement à de longues périodes (24 heures par exemple). L'analyse spectrale, quant à elle, permet d'une part de séparer les composantes de haute fréquence (sensées représenter avant tout le tonus vagal) des composantes de basse fréquence (reflétant essentiellement l'activité sympathique ou la balance vago-sympathique), et d'autre part d'analyser des périodes de temps infiniment plus courtes. Chez la souris, des périodes de quelques minutes à plusieurs heures peuvent être utilisées pour l'analyse spectrale. Les limites entre haute et basse fréquences ont été adaptées à la fréquence cardiaque de la souris à partir de ce qui a été fait chez l'homme (HF : 1.2 à 3.2 Hz ; LF : 0.32 à 1.2 Hz) (Shusterman *et al.*, 2002). Les analyses de variabilité de la fréquence cardiaque ont été réalisées grâce au logiciel ECG auto 1.5.12.10 (EMKA technologies, Paris, France).

II. ELECTROCARDIOGRAMME ENDOCAVITAIRE CHEZ LA SOURIS

Chez la souris, l'exploration électrophysiologique *in vivo* permet d'évaluer la vulnérabilité aux arythmies ainsi que le phénotype électrophysiologique de différentes lignées de souris transgéniques (Berul *et al.*, 1996). Des cathéters multipolaires permettent un recueil de l'activité électrique intracardiaque et l'analyse de sa propagation. Les protocoles de stimulation cardiaque ont été appliqués au niveau auriculaire et ventriculaire, permettant la détermination des périodes réfractaires aux différents étages et le déclenchement d'éventuelles arythmies.

La stimulation auriculaire permet d'étudier :

- la conduction auriculo-ventriculaire (intervalle AH et point de Wenckebach),
- la conduction du système His - Purkinje (intervalle HV),
- les périodes réfractaires de l'oreillette et du nœud auriculo-ventriculaire (PREA, PREAV),
- le temps de récupération sinusale (TRS).

L'utilisation des même modes de stimulation au niveau ventriculaire permet d'étudier la conduction nodale rétrograde, de déterminer les périodes réfractaires ventriculaires (PREV) et la susceptibilité au déclenchement d'arythmie ventriculaire.

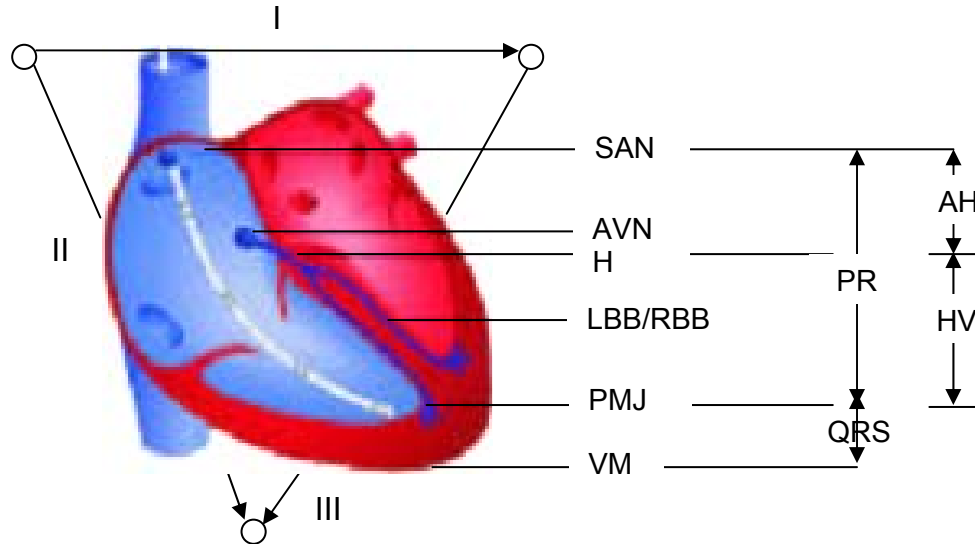


Figure 29 : Schéma du système de conduction cardiaque et intervalles de l'ECG de surface et endocavitaire. Les trois dérivations de l'ECG sont figurées ainsi qu'un cathéter intracardiaque dans les cavités droites du cœur. SAN, noeud sinusal ; AVN, noeud AV ; H, faisceau de His ; LBB/RBB, branches droite et gauche du faisceau de His ; PMJ, jonction fibres de Purkinje/myocytes ; VM, myocarde ventriculaire. D'après Jay *et al.*, 2004.

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (30mg/kg ; Ceva Santé Animale, Libourne, France) et d'étomidate (8mg/kg). Un ECG de surface (D1) est enregistré simultanément avec l'ECG endocavitaire. La température de l'animal est contrôlée et maintenue à 37°C. La veine jugulaire droite est isolée (Figure 30, page 90) afin d'y introduire une sonde octopolaire 2F (espacement inter électrodes de 0.5 mm ; Cordis Webster®, USA). La sonde octopolaire est ensuite finement avancée dans le cœur pour obtenir un enregistrement endocavitaire du faisceau de His et permettre une stimulation atriale ou ventriculaire. Les ECG intracardiaques sont enregistrés sur un ordinateur pour être analysés par la suite (IOX 1.585, EMKA Technologies, Paris, France).

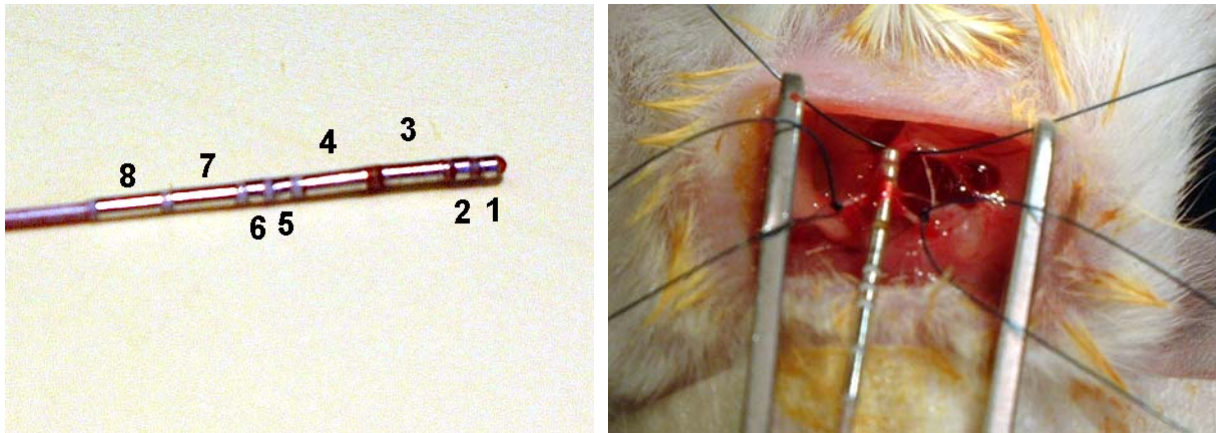


Figure 30 : Sonde octapolaire 2F et introduction dans la veine jugulaire droite.

La stimulation auriculaire ou ventriculaire programmée est réalisée grâce à un stimulateur UHS 20 Biotronik. Le seuil de stimulation correspondant à l'énergie minimale entraînant une dépolarisation est déterminé et les stimulations sont ensuite effectuées à une intensité de une fois et demi ce seuil. La durée d'impulsion est réglée à 1ms. Les protocoles de stimulation utilisés sont calqués sur les protocoles validés en pratique clinique humaine, adaptés à la fréquence cardiaque de la souris. Pour mesurer les périodes réfractaires effectives, un train de 9 stimuli à 100 ms de couplage est appliqué, suivi d'un extra stimulus avec un intervalle de couplage décroissant progressivement par pas de 2 ms à partir de 100 ms, jusqu'à obtention de la période réfractaire.

Une stimulation auriculaire de fréquence croissante permet de déterminer le point de Wenckebach (augmentation progressive de l'espace AH jusqu'au bloc auriculoventriculaire 2 : 1).

Le temps de récupération sinusale est déterminé grâce à des salves de stimulation d'une durée de 30 s à un intervalle de couplage de 100 et 80 ms.

L'introduction d'une sonde dans le cœur permet également d'induire un bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris par ablation du faisceau de His. Après détection 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 (3 et 4, figure 30). Cette ablation permet de créer un modèle permanent de bradycardie chez la souris, entraînant une hypertrophie cardiaque.

III. ENREGISTREMENT DES COURANTS IONIQUES PAR LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP

A. Sur cardiomyocytes isolés du nœud sinusal et du nœud AV

1. Prélèvement du nœud sinusal et du nœud AV chez la souris

Les cœurs sont prélevés sur des souris préalablement héparinées (250 UI, IP) et anesthésiées (etomidate 30 mg/kg ou pentobarbital 30 mg/kg, IP). Le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire, les oreillettes et les ventricules sont prélevés comme décrit précédemment (Mangoni & Nargeot, 2001 ; Lei *et al.*, 2004). Brièvement, après séparation des ventricules, les oreillettes sont placées dans une solution de Tyrode à 37°C contenant de l'héparine (50 UI/ml) et exposées face ventrale face au microscope. La région inter-cavale de l'oreillette droite et les veines caves supérieure et inférieure sont ouvertes de façon à exposer la face endocardique de l'oreillette droite. Comme le montre la préparation finale (Figure 31), le nœud sinusal est localisé entre la *crista terminalis* à gauche, le septum interatrial à droite et les orifices de la veine cave supérieure en haut et de la veine cave inférieure en bas. Le nœud AV est situé dans le triangle de Koch délimité par le sinus coronaire, la valve tricuspide et le septum ventriculaire droit. Les deux régions nodales, représentant une surface d'environ 1 mm², sont prélevées.

Lorsque les tissus nodaux sont destinés à des analyses de biologie moléculaire, ils sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'isolement des ARN totaux.

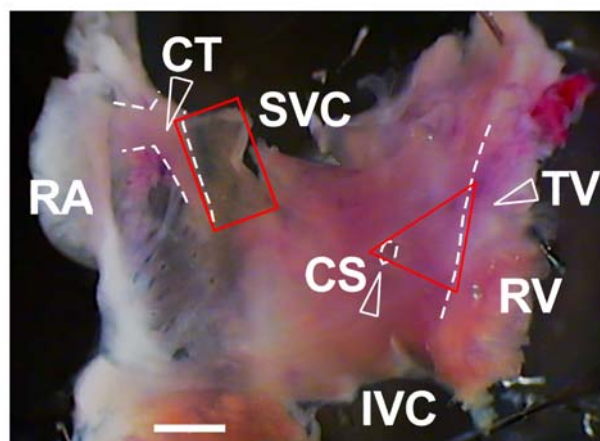


Figure 31 : Dissection du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire chez la souris. Le nœud sinusal et le nœud AV sont délimités respectivement par le rectangle et le triangle rouges. RA, oreillette droite ; CT, *crista terminalis* ; SVC, veine cave supérieure ; IVC, veine cave inférieure ; CS, sinus coronaire ; RV, septum ventriculaire droit ; TV, valve tricuspide. Echelle, 1 mm. D'après Marionneau *et al.*, 2005.

2. Dissociation des cardiomyocytes issus des nœuds

L'isolement de cardiomyocytes à partir du nœud sinusal et du nœud AV de souris afin d'enregistrer les courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$ a été réalisé par l'équipe de Matteo Mangoni, à l'Institut de Génétique Fonctionnelle de Montpellier,

Une fois la région du nœud sinusal et du nœud AV prélevée, les tissus sont transférés dans une solution de Tyrode à 35°C contenant (en mM/l) : NaCl, 140; KCl, 5.4; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; Hepes-NaOH, 5; et D-glucose, 5.5; (ajustement du pH à 7.4 avec NaOH). Puis les tissus sont mis dans une solution à faible concentration de Ca^{2+} et de Mg^{2+} contenant (en mM/l) : NaCl, 140; KCl, 5.4; $MgCl_2$, 0.5; $CaCl_2$, 0.2; KH_2PO_4 , 1.2; taurine, 50; D-glucose, 5.5; bovine serum albumin (BSA), 1 mg/ml; Hepes-NaOH, 5; (ajustement du pH à 6.9 avec NaOH). La digestion des tissus est permise par l'ajout de collagénase de type II (229 U/ml, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) et d'élastase (1.9 U/ml, Boehringer Mannheim, Allemagne), de protéase (0.9 U/ml, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), de BSA 1 mg/ml, et de 200 μ M de $CaCl_2$. La digestion est poursuivie sur une durée allant de 9 à 13 min à 35°C par agitation mécanique. Les tissus sont ensuite rincés et transférés dans un milieu de "Kraftbrühe" (KB) contenant (en mM/l) : L-acide glutamique, 70; KCl, 20; KOH, 80; ($\pm$)D- β -OH-acide butyrique, 10; KH_2PO_4 , 10; taurine, 10; BSA, 1 mg/ml; et Hepes-KOH, 10; (ajustement du pH à 7.4 avec KOH). Les cellules sinusales ou du nœud AV sont isolées par agitation manuelle dans la solution de KB à 35°C. Toutes les 2 minutes, de petits aliquots de solution de KB sont inspectés au microscope pour visualiser des cellules nodales isolées. L'automatisme cellulaire est restauré en réadaptant les cellules à une concentration extracellulaire en Ca^{2+} physiologique en ajoutant une solution contenant (en mM/l) : NaCl, 10, $CaCl_2$, 1.8, et une solution de Tyrode normale contenant du BSA (1 mg/ml). La solution finale dans laquelle sont stockées les cellules contient (en mM/l) : NaCl, 100; KCl, 35; $CaCl_2$, 1.3; $MgCl_2$, 0.7; L-acide glutamique, 14; ($\pm$)D- β -OH-acide butyrique, 2; KH_2PO_4 , 2; taurine, 2; BSA 1 mg/ml; (pH=7.4), et gentamycine (50 μ g/ml). L'ensemble des molécules provient de chez Sigma (St Quentin-Fallavier, France), sauf le ($\pm$)D- β -OH-acide butyrique qui provient de Fluka Chemika (Buchs, Suisse).

L'isolement des cardiomyocytes atriaux se fait sur le même principe que celui des myocytes du nœud sinusal et du nœud AV après leur séparation des ventricules.

3. Enregistrement des courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$

Les courants Ca^{2+} sont enregistrés à 26°C en configuration cellule entière, avec une concentration extracellulaire en Ca^{2+} de 2 mM. La résistance d'accès des cellules était autour

de 10 MΩ, les résistances séries sont évaluées au pic d' I_{Ca} et peuvent être corrigées jusqu'à 75%. Les courants capacitifs ne sont pas compensés électroniquement. Les courants Ca^{2+} sont enregistrés avec une solution extracellulaire contenant (en mmol/l) : TEA-Cl, 130; $CaCl_2$, 2; $MgCl_2$, 1; 4-amino-pyridine, 10; HEPES, 25; (ajustement du pH à 7.4 avec TEAOH). Les pipettes de patch étaient remplies par une solution contenant (mM) : CsCl, 130; EGTA, 10; HEPES, 25; Mg-ATP 3 and Na-GTP 0.4 (pH à 7.2 avec CsOH).

L'activité *pacemaker* est enregistré à 35°C en conditions de patch perforé, grâce à la β -escine mise dans la pipette (concentration finale 30 μ M). La composition de la solution intrapipette était (en mmol/l) : KCl, 130; NaCl, 10; sel ATP- Na^+ , 2; creatine phosphate, 6.6; GTP-Mg $^{2+}$, 0.1; $CaCl_2$, 0.04 (pCa 5.7) et Hepes-KOH, 10; (ajustement du pH à 7.2 avec KOH). La solution extracellulaire comprenait (en mmol/l) : NaCl, 140; KCl, 5.4; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; Hepes-NaOH, 5; et D-glucose, 5.5; (ajustement du pH à 7.4 avec NaOH).

Toutes les valeurs de potentiels ont été corrigées pour le potentiel de jonction. Les données électrophysiologiques ont été enregistrées et analysées à l'aide du logiciel pCLAMP suite ver 9.0 (Axon Instruments).

La dépendance au potentiel de l'activation des courants $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$ a été déterminée à partir des courbes courant-potentiel (I-V) qui ont été fittées en employant l'équation de Boltzmann : $I = G_{max}(V - V_{rev})/[1 + \exp[(V_{0.5,act} - V)/s]]$, où V_{rev} est le potentiel d'inversion extrapolé ; V , le potentiel de membrane ; I , le courant au pic ; G_{max} , la conductance cellulaire maximum ; $V_{0.5,act}$, le potentiel de demi-activation du courant et s , le facteur de Boltzmann.

B. Sur cardiomyocytes ventriculaires

L'enregistrement du courant I_{Na} sur les cardiomyocytes ventriculaires isolés chez les souris $Scn5a^{+/-}$ a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Hugues Abriel à l'Université de Lausanne en Suisse.

1. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires

Les souris sont héparinées (5000 UI/kg ; IP) puis anesthésiées avec du pentobarbital de sodium (50 mg/kg, IP). Après dislocation cervicale, le cœur est prélevé et perfusé de manière rétrograde par canulation de l'aorte en Langendorff pendant 3 min (3 ml/min). La solution perfusée est à 37°C et contient (en mmol/l): 4.75 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 35 NaCl, 16 Na_2HPO_4 , 25 $NaHCO_3$, 10 HEPES, 10 glucose, et 134 sucrose à un pH de 7.4. Durant l'isolation, du 2,3-butanedione monoxime (10 mmol/l) a été ajouté pour éviter l'altération des

cellules. Puis les cœurs ont été perfusés avec la même solution contenant de la collagénase de type II (Worthington Biochemical) pendant 15 min. Les myocytes ventriculaires ont ensuite été isolés par plusieurs centrifugations à vitesse lente (7 g, 1 min). Les myocytes sont alors resuspendus dans un milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), supplémentés avec 10% de serum de veau fœtal (GIBCO), 4% acides aminés nonessentiels (GIBCO), insulín-selenium-transferrin (GIBCO), 100 IU/ml pénicilline, et 0.1 mg/ml streptomycine (GIBCO). De la cytosine β -D-arabino-furanoside (10 μ mol/l, Sigma) a été ajoutée au milieu pour inhiber la prolifération des cellules non musculaires. Les myocytes ont enfin été placés dans des boîtes au fond recouvert de laminine (Sigma). Après une période d'adhésion d'1 h, les myocytes ont été rincés deux fois avec du milieu de culture sans serum pour éliminer les cellules non adhérentes, mortes et les débris.

2. Enregistrement du courant I_{Na}

La configuration cellule entière a été utilisée. Les expériences ont été menées à température ambiante (22-23°C), grâce à l'amplificateur VE-2 (Alembic Instruments) qui permet d'enregistrer des courants sodiques de fortes densités. Les pipettes (résistance 1-2 M Ω) étaient remplies d'une solution contenant 60 mM de CsCl, 70 mM de Cesium aspartate, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 10 mM d'HEPES, 11 mM d'EGTA et 5 mM de Na₂ATP (pH ajusté à 7.2 avec CsOH). Les myocytes baignaient dans une solution contenant 10 mM de NaCl, 120 mM de NMDG-Cl, 2 mM de CaCl₂, 1.2 mM de MgCl₂, 5 mM de CsCl, 10 mM d'HEPES, and 5 mM de Glucose (pH ajusté à 7.4 avec CsOH). Des sauts de potentiel de 20 ms sont imposés de -90 mV à 0 mV par paliers de 5 mV, à partir d'un potentiel de repos de -120 mV. Les densités d' I_{Na} (pA/pF) ont été obtenues en divisant le courant au pic par la capacité membranaire de la cellule. Cette dernière était calculée grâce au courant capacitif transitoire généré par une dépolarisation de +5-mV à partir du potentiel de repos.

IV. RT-PCR QUANTITATIVE

Cette technique a été utilisée sur des tissus nodaux et ventriculaires en collaboration avec Céline Marionneau qui a développé la quantification transcriptionnelle à haut débit au sein du laboratoire.

Les tissus nodaux prélevés comme décrit précédemment et stockés à -80°C peuvent être utilisés afin de quantifier l'expression cardiaque de plusieurs gènes d'intérêt. Les tissus

ventriculaires sont prélevés sur des animaux sacrifiés dans les mêmes conditions que pour l'isolement de cardiomyocytes ventriculaires. Puis les oreillettes sont séparées des ventricules, et chacune des parois libres des ventricules sont séparées du septum interventriculaire afin d'obtenir trois échantillons ventriculaires distincts. Chacun est congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à l'isolement des ARN totaux.

Les ARN totaux sont isolés à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen) puis traités à la DNase à l'aide des kits *RNeasy Fibrous Tissue Mini* ou *Micro Kits* (Qiagen). La qualité des ARN totaux est vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'acrylamide (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent). La concentration en ARN total est quantifiée par mesure de l'absorbance à 260 nm ($\text{DO}_{260\text{nm}}$, NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Un rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}} > 1,8$ atteste une faible contamination par des protéines. L'absence de contamination par l'ADN génomique est vérifiée par amplification PCR sur les ARN totaux sans RT préalable. La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir des ARN totaux (de 50 à 2000 ng) à l'aide du kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems).

La quantification par PCR de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de la technologie *TaqMan*. Le principe de la technologie *TaqMan* repose sur la propriété exonucléasique 5'-3' de la Taq DNA polymérase. A chaque cycle PCR, la Taq DNA polymérase clive l'extrémité 5' de la sonde *TaqMan* et libère ainsi le "reporteur" fluorescent. La fluorescence émise par celui-ci ne sera donc plus transférée au "quencheur" et pourra alors être mesurée à sa longueur d'onde spécifique. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produits PCR synthétisés. Cette technologie est commercialisée par la société Applied Biosystems sous la forme d'essais (*TaqMan Gene Expression Assays*) constitués d'un couple d'amorces (amorces sens et anti-sens) et d'une sonde *TaqMan* spécifiques d'un gène. Les sondes *TaqMan* sont marquées en 5' par le "reporteur" fluorescent 6-carboxyfluorescéine (FAM, Applera Corp.) et en 3' par un "quencheur" non-fluorescent. Elles sont en majorité inter-exoniques et permettent de quantifier toutes les isoformes issues d'épissages alternatifs. L'efficacité de PCR des essais est de 100%, autrement dit, la quantité de produits PCR est doublée à chaque cycle. Les essais *TaqMan* utilisés permettent de quantifier l'expression de nombreux gènes différents.

La quantification d'expression entreprise est une quantification relative qui utilise la méthode du $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001 ; figure 32). Le Ct (*threshold cycle*) correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour atteindre un seuil fixe (*threshold*) situé dans la phase linéaire de la courbe d'amplification sigmoïdale. Le Ct du gène x est normalisé par un gène de référence selon la formule $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_x - \text{Ct}_{\text{référence}}$. Le calcul du $\Delta\Delta\text{Ct}$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans une condition B par rapport à une condition A

($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). La transformation des valeurs logarithmiques en échelle linéaire permet enfin d'obtenir les ratios $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression d'un gène x par rapport au gène de référence. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression du gène x dans une condition expérimentale B par rapport à une condition expérimentale A.

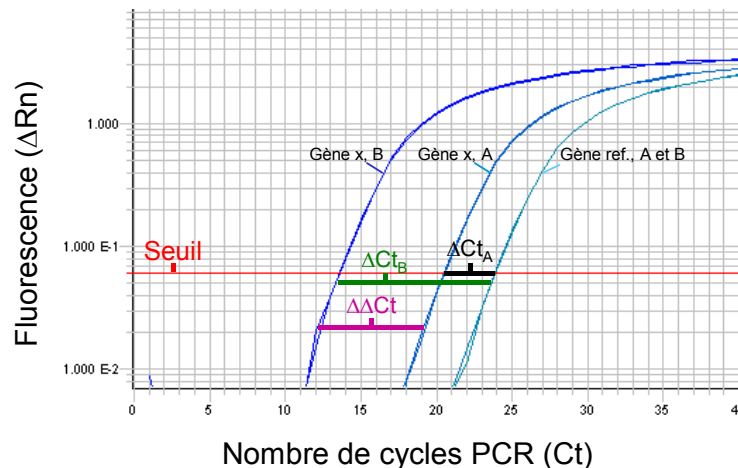


Figure 32 : Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. D'après Livak & Schmittgen, 2001. Pour chaque condition expérimentale (A et B), le ΔCt est calculé selon la formule: $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{ref.}$, où x correspond au gène analysé, et ref. au gène de référence utilisé pour la normalisation. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans la condition B par rapport à la condition A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). On notera ici que l'expression du gène de référence est stable entre les deux conditions A et B.

La quantification relative est effectuée en essais individuels ; ou à haut débit, c'est à dire sur 96 gènes en simultanément, grâce à l'utilisation des cartes microfluides ou *Low Density Arrays* (Applied Biosystems).

A. Quantification individuelle

Les amplifications PCR sont réalisées sur 10 ng d'ADNc à l'aide des essais *TaqMan* et des réactifs PCR *TaqMan Universal Master Mix* (1X, Applied Biosystems). L'amplification est réalisée en duplicat à 50°C, 2 min - 95°C, 10 min suivi de 40 cycles: 95°C, 15 sec - 60°C, 1 min dans un thermocycleur *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Les données sont collectées à l'aide du logiciel SDS 2.1 (Applied Biosystems). L'expression des gènes est analysée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

B. Quantification à haut débit

L'apparition des cartes microfluides (*Low density arrays*), constituées chacune de 384 puits préalablement chargés par un essai *TaqMan* spécifique d'un gène, permet d'évaluer simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes à partir d'un même échantillon (Figure 33). Huit réservoirs distribuent, via des micro-capillaires, les 384 puits disposés en 8 lignes de 48 puits. Les cartes utilisées dans les projets présentés ont une configuration 96 gènes qui permet d'amplifier 96 gènes dans 4 échantillons en simultané. Les 96 gènes étudiés codent pour différentes sous-unités α et auxiliaires des canaux ioniques, des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, des facteurs de transcription, ainsi que pour des marqueurs spécifiques des compartiments cardiaques, des vaisseaux, des neurones, des fibroblastes, de l'inflammation et de l'hypertrophie cardiaque (Marionneau *et al.*, 2005). Quatre gènes endogènes dont l'expression est connu pour être peu variable sont aussi présents afin de servir de gènes de référence. Cent nanogrammes d'ADNc combinés aux réactifs PCR *TaqMan Universal Master Mix* (1X) sont déposés dans chaque réservoir puis distribués par centrifugation via les micro-capillaires dans chacun des 48 puits. Chaque puits contient 1 ng d'ADNc dans un volume réactionnel de 1 μ l. Les puits sont scellés et les amplifications sont ensuite réalisées en simplicat à 50°C, 2 min - 94,5°C, 10 min suivi de 40 cycles: 97°C, 30 sec - 59,7°C, 1 min dans un thermocycleur *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System*. Les données provenant de plusieurs *Low Density Arrays* sont analysées simultanément et extraites à l'aide du logiciel SDS 2.1. La méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ permet ensuite d'exprimer les résultats. Les gènes dont le C_t est supérieur à 32 sont éliminés par manque de reproductibilité.

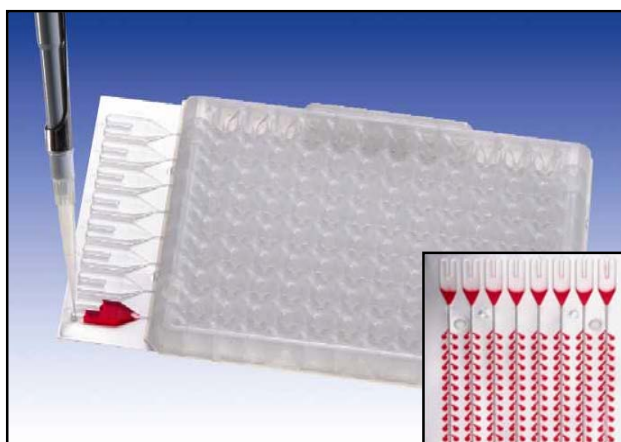


Figure 33 : Photographie d'une carte microfluide ou *Low Density Array*. Chaque réservoir distribue 48 puits, via un micro-capillaire.

C. Classification hiérarchique des données d'expression

La comparaison des profils d'expression est réalisée à l'aide du programme *Cluster* (Eisen *et al.*, 1998) qui permet d'évaluer les similarités d'expression entre les échantillons (et entre les gènes). Une classification hiérarchique à double entrée des résultats est réalisée. Les gènes sont en ligne et les échantillons sont représentés chacun par une colonne. Le niveau d'expression de chaque gène dans chacun des échantillons est représenté par un code couleur qui va du vert clair pour un faible niveau d'expression, à rouge foncé lorsque le gène est plus fortement exprimé. Les gènes sont regroupés horizontalement en *clusters* en fonction de la similitude de leurs profils d'expression. De la même manière, les échantillons sont regroupés verticalement, en fonction de leur similarité de profils. Les gènes (et les échantillons) ayant des profils d'expression les plus similaires sont les plus proches dans les dendrogrammes. L'analyse est réalisée à partir des valeurs de ΔCt obtenues pour chaque gène. Les dendrogrammes des échantillons et des gènes ainsi que la carte thermique obtenus sont visualisés à l'aide du programme *Treeview* (Eisen *et al.*, 1998).

V. STATISTIQUES

Tous les résultats présentés correspondent aux moyennes ($\pm$ SEM) obtenues à partir de plusieurs animaux et/ou expériences. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test *t* de Student, ou d'une analyse de variance (ANOVA) à une (ou deux) voie(s), complétée par un test de comparaison multiple, le test de Tukey. Une valeur de l'indice $p < 0,05$ est considérée comme significative.

RÉSULTATS

I. Bradycardie et ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire chez les souris invalidées pour la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ des canaux calciques de type T.

A. Introduction

Plusieurs classes de canaux ioniques sont exprimées dans le nœud sinusal (Irisawa *et al.*, 1993 ; Boyett *et al.*, 2000) mais le mécanisme précis permettant la dépolarisation diastolique et la contribution relative de chacun au déterminisme de la fréquence cardiaque reste sujet à débat.

Aux côtés des courants I_f , I_{Na} , et $I_{Ca,L}$, le courant $I_{Ca,T}$ a été proposé comme déterminant de l'automatisme des cellules du nœud sinusal chez le lapin (Hagiwara *et al.*, 1988). Par ailleurs, un courant $I_{Ca,T}$ a été enregistré dans les cellules sinusales chez la souris (Mangoni & Nargeot, 2001). Dans le système de conduction, ce courant est présent dans le nœud AV chez le lapin (Efimov *et al.*, 2004) et les fibres de Purkinje chez le chien (Hirano *et al.*, 1989 ; Tseng & Boyden, 1989).

Le clonage des sous-unités codant pour les canaux calciques de type T ($\text{Ca}_v3.x$) a ouvert la voie à l'exploration du déterminisme moléculaire du courant $I_{Ca,T}$ (Perez-Reyes, 2003). La sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ est celle qui est la plus fortement exprimée dans le nœud sinusal chez la souris adulte (Bohn *et al.*, 2000).

L'exploration d'un modèle de souris invalidées pour la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ des canaux calciques de type T, nous a permis de démontrer *in vivo* pour la première fois, le rôle fonctionnel du courant $I_{Ca,T}$ dans l'automatisme des cellules *pacemaker* et dans les propriétés conductrices du nœud AV. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue Circulation Research (Mangoni *et al.*, 2006 ; article 1, page 100).

Article 1

Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking $\text{Ca}_v3.1/\alpha_{1G}$ T-type calcium channels

Matteo E. Mangoni^{1#}, Achraf Traboulsie^{1#}, Anne-Laure Leoni², Brigitte Couette¹, Laurine Marger¹, Khai Le Quang², Elodie Kupfer¹, Anne Cohen-Solal¹, José Vilar⁴, Hee-Sup Shin³, Denis Escande², Flavien Charpentier², Joël Nargeot¹, Philippe Lory¹

¹ Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203 - INSERM U661 - Université de Montpellier I - Université de Montpellier II, Département de Physiologie, Montpellier, France.

² Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France.

³ Center for Calcium and Learning, Korea Institute of Science and Technology, Cheongryang, Seoul, Republic of Korea.

⁴ Cardiovascular Research Center, INSERM U689; Université Paris 7-Denis Diderot, Paris, France.

: These authors contributed equally to this study

Circulation Research, 2006, 98 : 1422-1430

Bradycardia and Slowing of the Atrioventricular Conduction in Mice Lacking Ca_v3.1/ α_{1G} T-Type Calcium Channels

Matteo E. Mangoni,* Achraf Traboulsie,* Anne-Laure Leoni, Brigitte Couette, Laurine Marger, Khai Le Quang, Elodie Kupfer, Anne Cohen-Solal, José Vilar, Hee-Sup Shin, Denis Escande, Flavien Charpentier, Joël Nargeot, Philippe Lory

Abstract—The generation of the mammalian heartbeat is a complex and vital function requiring multiple and coordinated ionic channel activities. The functional role of low-voltage activated (LVA) T-type calcium channels in the pacemaker activity of the sinoatrial node (SAN) is, to date, unresolved. Here we show that disruption of the gene coding for Ca_v3.1/ α_{1G} T-type calcium channels (*cacna1g*) abolishes T-type calcium current ($I_{Ca,T}$) in isolated cells from the SAN and the atrioventricular node without affecting the L-type Ca²⁺ current ($I_{Ca,L}$). By using telemetric electrocardiograms on unrestrained mice and intracardiac recordings, we find that *cacna1g* inactivation causes bradycardia and delays atrioventricular conduction without affecting the excitability of the right atrium. Consistently, no $I_{Ca,T}$ was detected in right atrium myocytes in both wild-type and Ca_v3.1^{-/-} mice. Furthermore, inactivation of *cacna1g* significantly slowed the intrinsic in vivo heart rate, prolonged the SAN recovery time, and slowed pacemaker activity of individual SAN cells through a reduction of the slope of the diastolic depolarization. Our results demonstrate that Ca_v3.1/T-type Ca²⁺ channels contribute to SAN pacemaker activity and atrioventricular conduction. (*Circ Res.* 2006;98:1422-1430.)

Key Words: pacemaker activity ■ T-type calcium channel ■ sinoatrial node ■ conduction ■ knockout mice

The initiation of the heartbeat requires coordination between the automaticity of the sinoatrial node (SAN) and excitability of the atrioventricular (AV) conduction tissue: the AV node (AVN) and the His–Purkinje fiber network. SAN automaticity is caused by the presence of the diastolic depolarization.¹ Multiple classes of ionic channels are expressed in the SAN,^{1,2} but the precise mechanism initiating the diastolic depolarization has not been entirely elucidated, and the relative contribution of different ionic channels in establishing the heart rate under specific physiological conditions is still a matter of debate.^{3–5} Strong functional, pharmacological, and genetic evidence show that the hyperpolarization-activated currents I_f ^{6,7} and $I_{Ca,L}$ ^{8–10} play major roles in controlling the diastolic depolarization after decaying of the fast component of delayed-rectifier K⁺ currents (I_{Kr}). Diastolic release of Ca²⁺ mediated by ryanodine receptors (RyRs) has been indicated as an important mechanism for controlling SAN pacemaking under activation of the β -adrenergic receptor.¹¹ The SAN also expresses neuronal

tetrodotoxin (TTX)-sensitive and cardiac TTX-resistant voltage-dependent Na⁺ currents (I_{Na}).¹² TTX-sensitive I_{Na} is involved in SAN pacemaking in the newborn rabbit¹³ and in the adult mouse.^{12,14} The cardiac TTX-resistant *SCN5A*-mediated I_{Na} is important for conduction from the SAN to the atrium and in intranodal conduction.¹⁵ I_{Na} is also expressed in the rabbit¹⁶ and guinea pig¹⁷ AVN and contributes to the fast AV conduction pathway.¹⁸ Consistently, heterozygous mice lacking *SCN5A* channels have major AV conduction dysfunction.¹⁹

$I_{Ca,T}$ has also been proposed to contribute to pacemaking in primary SAN²⁰ as well as in latent pacemaker cells of the right atrium (RA).²¹ $I_{Ca,T}$ is expressed in pacemaker cells of mammals, including the rabbit²⁰ and the mouse.²² $I_{Ca,T}$ is also expressed in the cardiac conduction system, the rabbit AVN,¹⁸ and in canine Purkinje cells.^{23,24} The functional role of $I_{Ca,T}$ in the cardiac primary pacemaker and conduction tissue remains to be elucidated.

Molecular cloning of 3 T-type Ca²⁺ channel pore-forming subunits, namely the Ca_v3.1/ α_{1G} , Ca_v3.2/ α_{1H} , and Ca_v3.3/ α_{1I}

Original received November 5, 2004; resubmission received December 5, 2005; revised resubmission received March 30, 2006; accepted April 27, 2006.

From the Institut de Génomique Fonctionnelle (M.E.M., A.T., B.C., L.M., E.K., A.C.-S., J.N., P.L.), CNRS UMR5203-INSERM U661-Université de Montpellier I–Université de Montpellier II, Département de Physiologie, Montpellier; Institut du Thorax (A.-L.L., K.L.Q., D.E., F.C.), INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes; Cardiovascular Research Center (J.V.), INSERM U689, Université Paris 7-Denis Diderot, Paris, France; and Center for Calcium and Learning (H.-S.S.), Korea Institute of Science and Technology, Cheongryang, Seoul, Republic of Korea.

*Both authors contributed equally to this study.

Correspondence to Dr Matteo Mangoni, Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203-INSERM U661, Université de Montpellier I–Université de Montpellier II, Département de Physiologie, 141, rue de la Cardonille, Montpellier cedex 05, F-34094 France. E-mail matteo.mangoni@igf.cnrs.fr

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000225862.14314.49

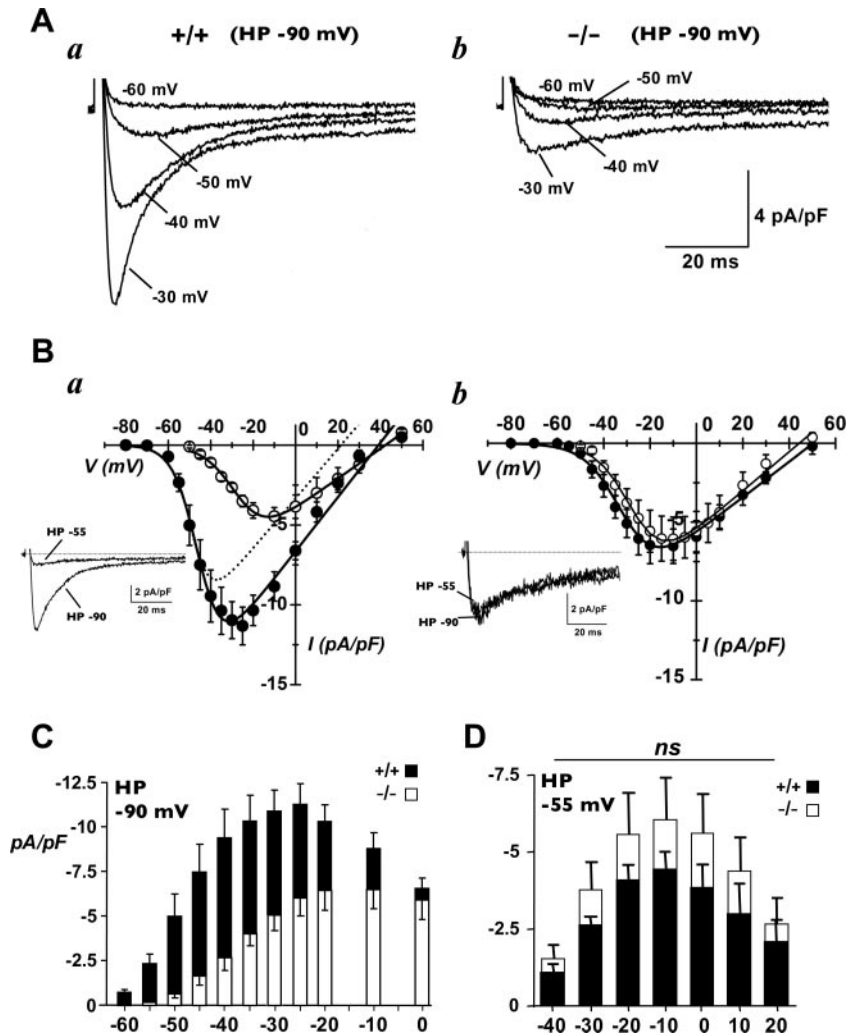


Figure 1. $I_{Ca,T}$ in SAN cells from WT and $Ca_v3.1^{-/-}$ mice. A, Typical sample I_{Ca} traces obtained using a HP at -90 mV in a SAN cell from WT (a) and $Ca_v3.1^{-/-}$ (b) mice. B, Average I-V curves of the Ca^{2+} current obtained on WT (a) and $Ca_v3.1^{-/-}$ (b) SAN cells using a HP at -90 mV (filled symbols) and -55 mV (open symbols). Traces obtained at a test potential of -35 mV, from a HP of -90 and -55 mV, are shown in each inset in a and b, as indicated. The net $I_{Ca,T}$ I-V curve recorded in WT SAN cells is indicated with a dotted line in a and b. C, Histogram showing the relative density of $I_{Ca,T}$ and $I_{Ca,L}$ at different test potentials as indicated. $I_{Ca,T}$ was measured in SAN cells from WT (filled bar), and $I_{Ca,L}$ was measured in SAN cells from $Ca_v3.1^{-/-}$ mice (open bar). HP was -90 mV for $I_{Ca,T}$ and $I_{Ca,L}$. D, Density of $I_{Ca,T}$ and $I_{Ca,L}$ in SAN cells from WT (open bar) and $Ca_v3.1^{-/-}$ (filled bar) mice at different test potentials. ns indicates not significant.

subunits, has fostered investigation of the role of native $I_{Ca,T}$.²⁵ Here, we describe that $Ca_v3.1$ knockout ($Ca_v3.1^{-/-}$) mice lack $I_{Ca,T}$ in both SAN pacemaker and AVN cells and display slowed pacemaker activity and AV conduction. Our results constitute the first direct functional demonstration of the participation of $Ca_v3.1$ channels in pacemaking and cardiac conduction.

Materials and Methods

The generation of the $Ca_v3.1^{-/-}$ mouse line was originally described by Kim et al.²⁶ The experimental procedure for electrophysiological recording of isolated cells from the SAN, the AVN, and the RA is described in the expanded Materials and Methods section in the online data supplement, available at <http://circres.ahajournals.org>. Detailed procedures for in vivo surface and intracardiac electrocardiograms (ECGs), measurement of blood pressure, RT-PCR, and quantitative RT-PCR experiments (supplemental Figure II) and numerical modeling of pacemaker activity are available in the expanded online Materials and Methods section. Results are presented as the mean $\pm$ SEM. Statistical significance was assessed by the unpaired Student's *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant. N indicates the number of mice used and n the number of cells considered.

Results

$Ca_v3.1^{-/-}$ SAN Pacemaker Cells Lack $I_{Ca,T}$

Electrophysiological recordings obtained on SAN cells of wild-type (WT) and $Ca_v3.1^{-/-}$ animals revealed that $I_{Ca,T}$ related to $Ca_v3.1$ is a major component of the total Ca^{2+} current (I_{Ca}) in SAN cells (Figure 1). Figure 1A shows representative I_{Ca} traces recorded from a holding potential (HP) of -90 mV in WT (Figure 1Aa) and $Ca_v3.1^{-/-}$ (Figure 1Ab) SAN cells. No difference in the cell capacitance was detected (see supplementary Figure I). Corresponding current-voltage (I-V) curves are presented in Figure 1B (filled symbols). $I_{Ca,L}$ was measured by applying depolarizing steps from a HP of -55 mV (Figure 1B, open symbols), revealing $I_{Ca,T}$ by subtraction of records from a HP of -55 mV from those obtained from a HP of -90 mV (Figure 1Ba, dotted line). Consistently, switching the HP from -90 to -55 mV significantly shifted I_{Ca} voltage for half activation ($V_{0.5act}$) to more positive values (-45 ± 1 mV; $k = 5.7 \pm 0.6$ mV from a HP of -90 mV and -28 ± 1 mV; $k = 6.3 \pm 0.3$ mV from a HP of -55 mV, $N = 9$, $n = 17$, $P < 0.05$) in all tested cells ($n = 17$), revealing further a $V_{0.5act}$ of -47 ± 1 mV for the net $I_{Ca,T}$ (Figure 1Ba, dotted line). In contrast to WT SAN cells, none

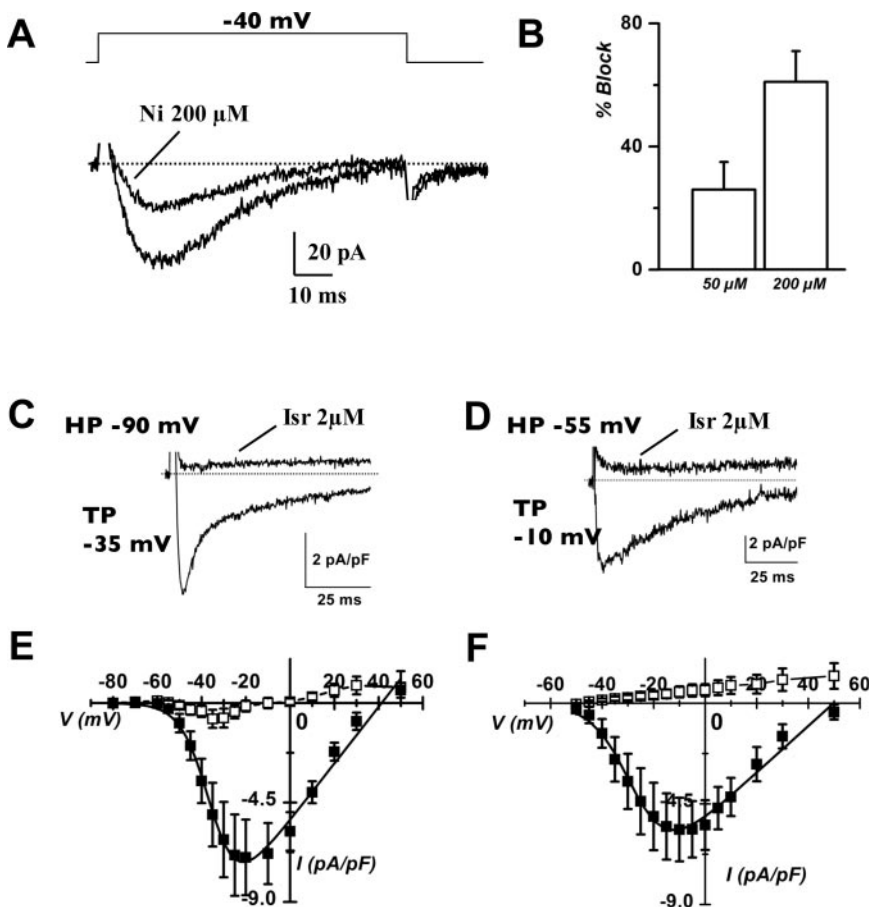


Figure 2. A and B, Sample traces showing partial block of $I_{\text{Ca,T}}$ by 200 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} in WT SAN cells (A) and histogram of the percentage of inhibition at 50 and 200 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} (B). C and D, Isradipine (Isr) block of I_{Ca} in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cells measured from a HP of -90 mV (C) and -55 mV (D) as indicated. Note that no residual dihydropyridine-resistant $I_{\text{Ca,T}}$ is recorded in cells lacking $\text{Ca}_v3.1$ channels at the corresponding peak of $I_{\text{Ca,T}}$ recorded in WT cells (-35 mV). E and F, Corresponding averaged I-V curves in control conditions (filled boxes) and 2 $\mu\text{mol/L}$ isradipine (open boxes).

of the tested $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ cells displayed detectable $I_{\text{Ca,T}}$ (Figure 1Bb). Indeed, in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cells, switching to a HP of -55 mV did not alter significantly voltage dependence of I_{Ca} activation (HP, -90 mV: $V_{0.5\text{act}} = -30 \pm 1$ mV; $k = 8.0 \pm 1.3$ mV, $n = 14$; and HP -55 mV: -28 ± 1 mV; $k = 6.3 \pm 0.3$ mV, $N = 10$, $n = 15$, $P = \text{NS}$). Subtraction between traces from HP -90 mV and from HP -55 mV identified no residual $I_{\text{Ca,T}}$, because current waveforms displayed slow inactivation kinetics (Figure 1Bb, inset) and no criss-crossing of the current traces. A comparison of the current density values in WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cells at HP -90 mV is shown in Figure 1C (black and white bars, respectively) to estimate the $I_{\text{Ca,T}}$ component related to $\text{Ca}_v3.1$. At -40 mV, $I_{\text{Ca,T}}$ density was 6.8 ± 1.6 pA/pF (+/+ , $N = 9$, $n = 18$) and $I_{\text{Ca,L}}$ density was 2.6 ± 0.7 pA/pF, (-/- , $N = 10$, $n = 14$). $I_{\text{Ca,L}}$ density was not significantly affected by inactivation of $\text{Ca}_v3.1$ channels (Figure 1D). Indeed, $I_{\text{Ca,L}}$ peak densities at -10 mV (HP, -55 mV) were 6.0 ± 1.6 pA/pF, $N = 9$, $n = 15$; and 4.5 ± 0.6 pA/pF, $N = 10$, $n = 11$ in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ and WT SAN cells, respectively. Taken together, these data showed that inactivation of $\text{Ca}_v3.1$ channels abolished $I_{\text{Ca,T}}$ and had no significant effect on $I_{\text{Ca,L}}$ in SAN cells.

To determine whether the pharmacological sensitivity of the SAN $I_{\text{Ca,T}}$ is consistent with the expression of the $\text{Ca}_v3.1$ subunit, we tested its sensitivity to Ni^{2+} ions (Figure 2A and 2B). Application of Ni^{2+} concentrations of 50 and 200 $\mu\text{mol/L}$ inhibited $26 \pm 9\%$ ($N = 2$, $n = 4$) and $61 \pm 10\%$ ($n = 9$) of $I_{\text{Ca,T}}$, respectively. Because the IC_{50} values for Ni^{2+}

on recombinant $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ T-type channels are in the range of 100 to 200 $\mu\text{mol/L}$ and 5 to 10 $\mu\text{mol/L}$, respectively,²⁷ these results indicate that $I_{\text{Ca,T}}$ in mouse adult SAN cells is generated by the $\text{Ca}_v3.1$ subunit. Consistent with these findings, real-time RT-PCR experiments showed that the $\text{Ca}_v3.1$ subunit is the predominant T-type Ca^{2+} channel isotype in the SAN of the adult mouse (supplemental Figure II). Furthermore, application of 2 $\mu\text{mol/L}$ of the 1,4-dihydropyridine $I_{\text{Ca,L}}$ blocker isradipine on $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cells blocked I_{Ca} by $93 \pm 4\%$ ($N = 5$, $n = 7$, Figure 2C and 2E) from a HP of -90 mV and by 100% from a HP of -55 mV ($N = 5$, $n = 8$, Figure 2D and 2F). Such a sensitivity to isradipine further confirmed that the remaining I_{Ca} in SAN cells from $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice was $I_{\text{Ca,L}}$.

Sedated $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ Mice Have Intrinsic Slower Heart Rate and Prolonged AV Conduction

We next performed surface ECG recordings on sedated WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (Figure 3). Because the heart rate is highly regulated by the balance between the sympathetic and vagal input, which depends on the levels of stress and anesthesia, ECGs were also recorded after injection of propranolol and atropine to block the autonomic nervous system (ANS).²⁸ Recording examples collected from WT (+/+) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-/-) mice before and after the ANS block are presented in Figure 3A. The loss of the $\text{Ca}_v3.1$ subunit induced a significant (9%) prolongation of the atrioventricular conduction (PQ interval) under baseline conditions (34 ± 1

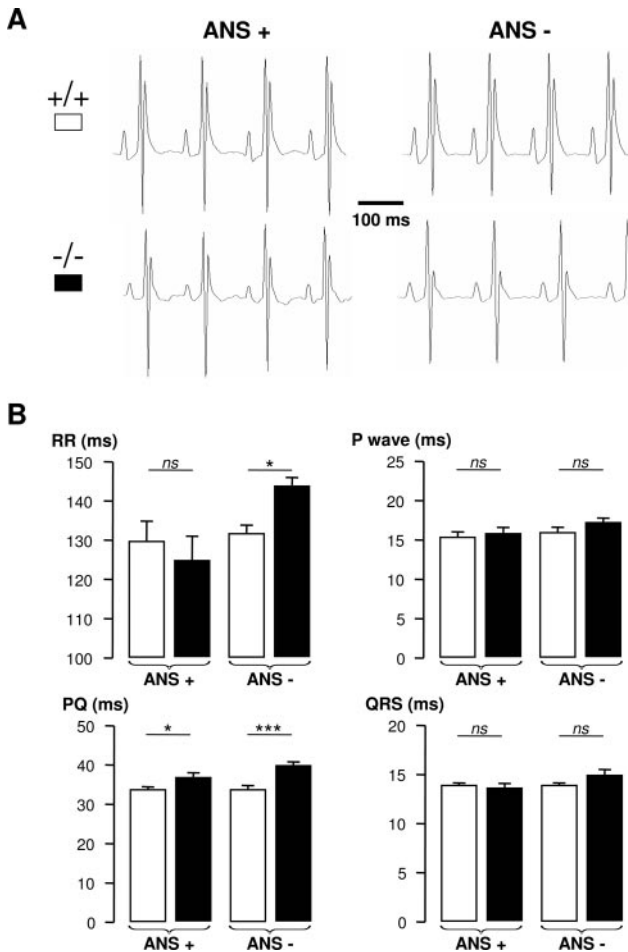


Figure 3. Surface ECGs obtained on sedated WT (+/+) and Ca_v3.1^{-/-} (-/-) mice. A, Representative lead I ECG traces obtained from WT and Ca_v3.1^{-/-} under baseline conditions (ANS+) (left panels) and after injection of atropine and propranolol to block the ANS (ANS-) (right panels). B, Histograms of the average RR interval, P wave duration, PQ interval, and QRS interval, respectively, obtained from WT (open bars) and Ca_v3.1^{-/-} (filled bars) mice, before (ANS+) and after (ANS-) blockade of the ANS.

ms, N=11, and 37±1 ms, N=12 for WT and Ca_v3.1^{-/-} mice, respectively; $P<0.05$). The heart beat (RR interval), P wave duration, and QRS interval (Figure 3B), as well as the QTc interval (data not shown; 62±1 ms and 61±1 ms for WT and Ca_v3.1^{-/-} mice, respectively; $P>0.05$), were not significantly modified. In conditions of ANS block, the intrinsic heart rate was significantly slowed by ≈10%. Indeed, the RR interval was significantly longer in Ca_v3.1^{-/-} mice than in WT animals (144±2 ms and 132±2 ms, respectively; $P<0.05$; Figure 3B). The PQ interval was also markedly prolonged (34±1 ms and 40±1 ms in WT and Ca_v3.1^{-/-} animals, respectively; $P<0.001$; Figure 4B). The other ECG parameters were not significantly modified.

SAN Cells From Ca_v3.1^{-/-} Mice Display Slowed Pacemaker Activity

The spontaneous activity of isolated SAN cells was studied to evaluate whether the slowing of the intrinsic heart rate observed in vivo in Ca_v3.1^{-/-} mice was associated with

dysfunction of SAN cell automaticity. Representative recordings obtained on WT and Ca_v3.1^{-/-} SAN cells are presented in Figure 4A (upper and lower traces, respectively). Analysis of these recordings showed that inactivation of *cacna1g* gene resulted in a 37% slowing of the cellular beating rate (163±13 bpm, N=4, n=15 in Ca_v3.1^{-/-}, and 234±19 bpm, N=5, n=14 in SAN cells from WT mice; $P<0.01$; Figure 4B). Slowing of cellular pacemaking was accompanied by a reduction of the diastolic depolarization slope of ≈44% (Figure 4C). No significant changes in the maximum diastolic potential (MDP) and the voltage threshold of the action potential upstroke (E_{th}) were observed (MDP: -56.9±1.3 mV in WT, n=15, and -58.2±1.4 mV for Ca_v3.1^{-/-} SAN cells, n=14; E_{th} : -45±1.3 mV in WT and -43±1.4 mV in Ca_v3.1^{-/-} SAN cells; Figure 4D). Also, the action potential duration (147±15 and 141±10 ms for Ca_v3.1^{-/-} and WT SAN cells, respectively; Figure 4E) and the action potential amplitude (APA) (92±8 and 90±8 mV for Ca_v3.1^{-/-} and WT SAN cells, respectively; not shown) were comparable in SAN cells from WT and Ca_v3.1^{-/-} mice.

Intracardiac Electrophysiology Study of Ca_v3.1^{-/-} Mice

The AV conduction delay in mice lacking Ca_v3.1 channels was measured under baseline intracardiac recording conditions. Eight of 10 WT and 7 of 9 Ca_v3.1^{-/-} mice had a distinctly visible His-bundle electrogram (Figure 5A). In this group of animals, atrial-His (AH) conduction times were significantly longer in Ca_v3.1^{-/-} mice (31±1 ms) than in WT animals (25±1 ms; $P<0.001$; Figure 5B). However, His-ventricle (HV) intervals were comparable (11±1 and 10±1 ms for WT and Ca_v3.1^{-/-} mice, respectively; $P>0.05$). Effective refractory periods at the atrial (AERP), atrioventricular (AVERP), and ventricular (VERP) levels were investigated at a basic cycle length of 100 ms (Figure 5C). AERP and VERP were not significantly different between WT and Ca_v3.1^{-/-} mice. In contrast, the AVERP was significantly longer in Ca_v3.1^{-/-} mice (58±6 ms; N=8) than in WT animals (44±2 ms; N=10; $P<0.05$). Decremental atrial pacing revealed that Wenckebach cycle length was significantly longer in Ca_v3.1^{-/-} mice than in WT mice (85±5 ms and 67±2 ms, respectively; $P<0.01$; Figure 5C). Atrial pacing confirmed SAN dysfunction. Indeed, the corrected SAN recovery time (cSNRT) was longer in Ca_v3.1^{-/-} mice than in WT mice (31±5 in Ca_v3.1^{-/-} and 17±2 ms in WT mice $P<0.05$; n=7 and 9, respectively).

AVN Cells From Ca_v3.1^{-/-} Mice Lack $I_{Ca,T}$

We then tested whether dysfunction of AV conduction observed on inactivation of Ca_v3.1 channels was associated with downregulation of $I_{Ca,T}$ in the AVN. $I_{Ca,T}$ and $I_{Ca,L}$ were recorded in isolated AVN cells using the same recording protocols as for SAN cells (Figure 6). $I_{Ca,T}$ was found in all the WT AVN cells investigated (Figure 6A). Indeed, switching the HP from -90 to -60 mV significantly shifted the $V_{0.5act}$ of the total I_{Ca} from -34±0.7 to -23±0.8 mV (n=7, $P<0.05$). In contrast, no $I_{Ca,T}$ could be recorded in Ca_v3.1^{-/-} AVN cells (Figure 6Ab), and switching the HP from -90 to -60 mV did not shift the $V_{0.5act}$ value (-25±1.3 mV to

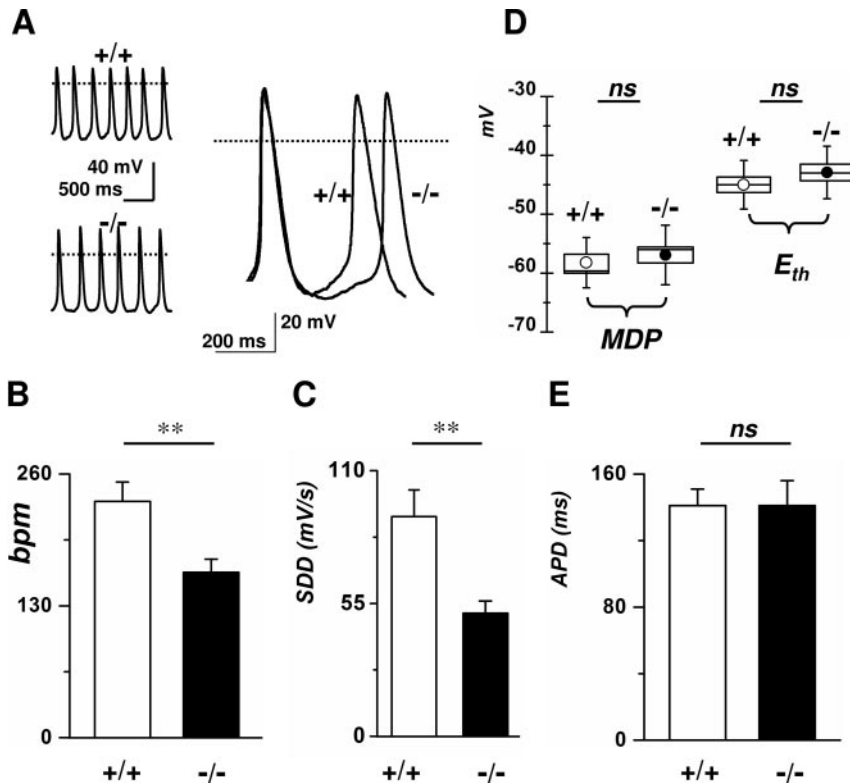


Figure 4. Pacemaker activity of isolated WT (+/+) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-/-) SAN cells. A, Representative sweeps of spontaneous action potentials obtained from SAN cells from WT (upper left trace) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (lower left trace). Superimposition of typical action potentials from a WT (+/+) and from $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cell (-/-) is shown in phase in the right panel. B and C, Histograms of the average bpm value (B) and the slope of the diastolic depolarization (SDD) (C) SAN cells. D, Box histograms showing the average MDP and the E_{th} in SAN cells from WT (+/+) (open circles) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-/-) (filled circles). Corresponding 25th and 75th percentile define the box. E, Action potential duration (APD) measured in WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ SAN cells.

-27 ± 0.8 mV, respectively; $P = \text{NS}$; Figure 6Bb). The peak density of the residual I_{Ca} measured from a HP of -60 mV in AVN cells was not altered by inactivation of $\text{Ca}_v3.1$ channels (4.1 ± 0.5 pA/pF, $N=5$, $n=7$ in WT and 4.6 ± 0.7 pA/pF, $N=4$, $n=7$ in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$; $P = \text{NS}$). In addition, no $I_{\text{Ca,T}}$ could be detected in isolated cells from the RA of WT adult mice (Figure 6C and 6D), because switching the HP from -100 to -50 mV produced no change both in the $V_{0.5\text{act}}$ (-16 ± 2 and -17 ± 1 mV, $N=3$, $n=8$, $P = \text{NS}$; Figure 6D) and in the peak density (6.9 ± 1.5 and 7 ± 1 pA/pF, $N=3$, $n=8$, $P = \text{NS}$; Figure 6C).

Bradycardia in Conscious Unrestrained $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ Mice

Both the heart rate and the AV conduction were altered in freely moving $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (Figure 7A and 7B and the Table). The mean heart rate was significantly slowed in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice, when considering a 24-hour period or during the day and night periods (Figure 7B and the Table). The maximum cardiac frequency during short periods of activity (40 seconds) was unchanged (Table), suggesting that activation of other ionic channels involved in SAN automaticity can compensate for the lack of $I_{\text{Ca,T}}$ during strong activation of the sympathetic nervous system. Spectral analysis of RR signals in the frequency domain revealed no differences between the 2 groups of mice. Total spectral power, ultralow (ULF), very-low (VLF), low (LF), and high (HF) frequencies were not significantly modified between WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (Figure 7C, data not shown for ULF and VLF), indicating that the degree of autonomic regulation of heart rate was not altered in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice.

Telemetric recordings also confirmed the prolongation of the PQ interval in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (Table), demonstrating that the propagation of the heartbeat through the AV conduction system was delayed in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice. This effect was independent from the heart rate because measurements were performed at comparable heart rates (600 bpm; cycle length of 100 ms). In contrast, the atrial conduction (as assessed by the P wave duration), the ventricular conduction (QRS interval), and ventricular repolarization (QT interval) were unchanged (Table). In addition, we did not find evidence for cardiac arrhythmias in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice. Also, no significant difference in the systolic, diastolic, and mean arterial pressure (60 ± 8 mm Hg, $N=8$ in WT and 72 ± 5 mm Hg, $N=8$ in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice; $P = \text{NS}$) was observed between the 2 mouse strains (Figure 7D).

Discussion

The major finding of this study is that genetic inactivation of the $\text{Ca}_v3.1/\alpha_{1G}$ T-type Ca^{2+} channels in mice results in a significant slowing of the heart rate and AV conduction. Downregulation of $I_{\text{Ca,T}}$ in both SAN and AVN cells of $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ animals is documented, accounting for this in vivo phenotype. The lack of $\text{Ca}_v3.1$ channels in isolated SAN cells induces slowing of pacemaker activity through a reduction of the slope of the diastolic depolarization. Our study provides novel and compelling genetic evidence for a direct contribution of $\text{Ca}_v3.1$ channels in the setting of the mammalian cardiac impulse generation and propagation by contributing to both the diastolic depolarization in the SAN and impulse conduction through the AVN.

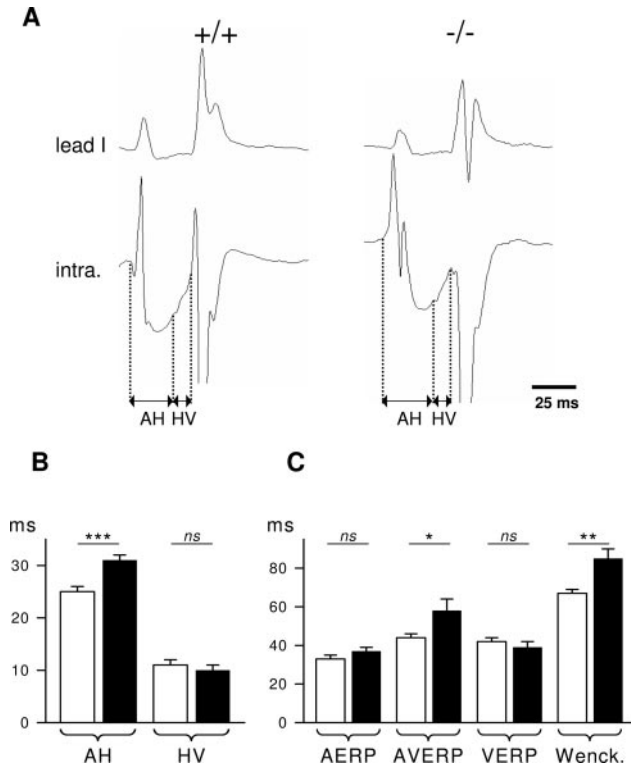


Figure 5. Cardiac electrophysiology studies in anesthetized WT (+/+) and Ca_v3.1^{-/-} (-/-) mice. A, Representative surface lead I ECG and intracardiac (intra.) recordings under baseline conditions. B, Histograms of the average AH and HV intervals measured in baseline conditions in WT (open bars; N=8) and Ca_v3.1^{-/-} (filled bars; N=7) mice. RR intervals were 111±3 and 122±4 ms for WT and Ca_v3.1^{-/-} mice, respectively ($P<0.05$). C, Histograms of the average atrial effective refractory period (AERP), atrioventricular ERP (AVERP), ventricular ERP (VERP), and AV Wenckebach cycle length (Wenck.) in WT (open bars; N=9 to 10) and Ca_v3.1^{-/-} (filled bars; N=6 to 8) mice.

$I_{Ca,T}$ in SAN and AVN Cells Following Inactivation of Ca_v3.1 Channels

A striking observation of this study is that $I_{Ca,T}$ in the mouse SAN is predominantly generated by the Ca_v3.1 subunit because we found no evidence for a residual $I_{Ca,T}$ in Ca_v3.1^{-/-} mice in both SAN (Figure 1) and AVN cells (Figure 6). The low sensitivity of SAN $I_{Ca,T}$ to Ni²⁺ is consistent with that observed on recombinant Ca_v3.1-mediated $I_{Ca,T}$.²⁷ Also consistent with our general findings is the recent observation that Ca_v3.2^{-/-} mice showed no ECG alterations.²⁹ Inactivation of Ca_v3.1 channels did not significantly modify the expression of $I_{Ca,L}$ in Ca_v3.1^{-/-} in both SAN and AVN cells. Our data show, therefore, that expression of Ca_v3.2, Ca_v1.3, and Ca_v1.2 subunits do not compensate for the lack of Ca_v3.1 channels in Ca_v3.1^{-/-} mice.

Bradycardia and Atrioventricular Dysfunction in Ca_v3.1^{-/-} Mice

ECGs and intracardiac recordings document both bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in Ca_v3.1^{-/-} mice. Several lines of evidence indicate that bradycardia is attributable to slowing of the pacemaker activity in the SAN. First, bradycardia was evident in sedated mice under pharmacological blockade of the ANS input for heart rates that

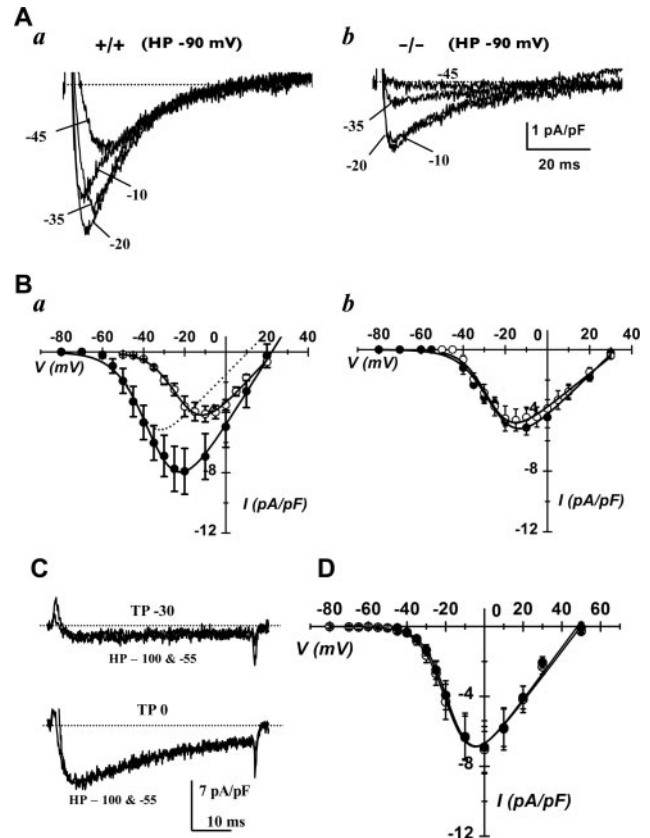


Figure 6. Recordings of I_{Ca} in isolated AVN and RA cells from WT and Ca_v3.1^{-/-} mice. A, Sample I_{Ca} traces obtained using a HP at -90 mV in a AVN cell from WT (a) and Ca_v3.1^{-/-} (b) mice. B, I-V curves of I_{Ca} obtained on WT (a) and Ca_v3.1^{-/-} (b) SAN cells using a HP at -90 mV (filled symbols) and -60 mV (open symbols). The I-V curve of $I_{Ca,T}$ calculated by subtracting records at HP of -60 mV from that at HP of -90 mV are shown as a dotted line. C and D, Lack of $I_{Ca,T}$ in RA cells from WT mice. Sample traces recorded from a HP of -100 mV at test potential (TP) values of -30 and 0 mV are shown in C; Averaged I-V curves marked as in (B) are shown in D.

were comparable with the mean heart rate observed in freely moving mice. Second, slowing of the heart rate was observed in freely moving mice in the absence of a significant change both in the heart rate variability profile and in the arterial blood pressure, thus arguing against the hypothesis that bradycardia would be caused by dysfunction in the autonomic regulation of the heart rate or could be secondary to a change in the control of the vascular tone. The prolongation of the SAN recovery time also indicates dysfunction in SAN automaticity. Finally, the slowing of pacemaker activity observed in isolated SAN pacemaker cells of Ca_v3.1^{-/-} mice is consistent with bradycardia being attributable to the lack of $I_{Ca,T}$ in the SAN. The reduction of the mean heart rate measured on freely moving Ca_v3.1^{-/-} mice is moderate, compared with the slowing of the cycle length in isolated pacemaker cells (10% in freely moving mice and 37% in isolated cells). This difference can be caused by the compensatory adrenergic tone in vivo, which stimulates ionic mechanisms involved in pacemaking, such as Ca_v1.3-mediated $I_{Ca,L}$ ^{9,10} and I_f ⁶ and RyR-dependent diastolic release of Ca²⁺.¹¹ The observation that the maximal heart rate is comparable in WT and

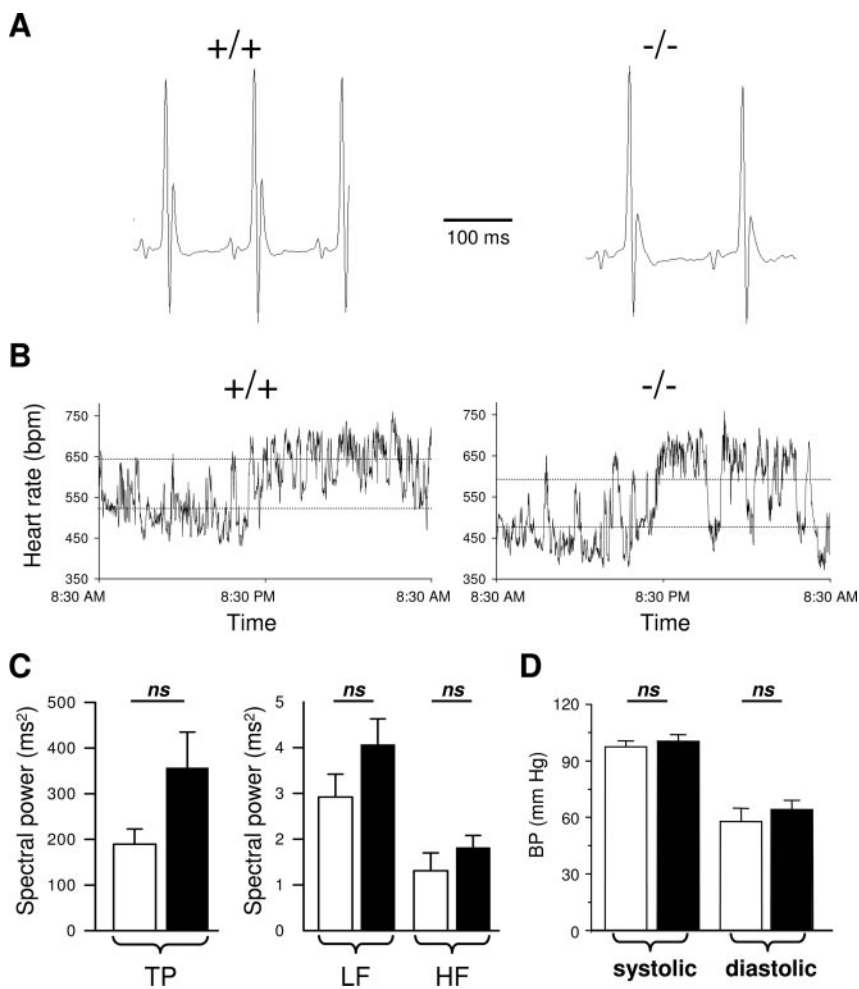


Figure 7. Twenty-four-hour telemetric ECG recordings in conscious unrestrained WT (+/+) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-/-) mice. **A**, Representative ECG recordings obtained on WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ animals during daytime. **B**, Examples of circadian variation of heart rate (in bpm) in WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice over a 24-hour period. Dashed lines indicate mean day and night heart rates. **C**, Spectral analysis of heart rate variability. Results are illustrated for total power spectra (0 to 3.2 Hz) and specific frequency bands, ie, low frequency (LF) (0.32 to 1.2 Hz) and high frequency (HF) (1.2 to 3.2 Hz). Note that during the study period, heart rate was significantly slowed in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice (455 ± 13 bpm and 515 ± 10 bpm for $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ and WT mice, respectively; $P < 0.005$). TP indicates, test potential. **D**, Measurements of the systolic and diastolic blood pressure in WT (open bars; $n=8$) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (filled bars; $n=8$) mice.

$\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice is consistent with this hypothesis. Comparison of mice lacking $\text{Ca}_v1.3$ ⁹ and $\text{Ca}_v3.1$ channels (this study) indicate that $I_{\text{Ca,L}}$ and $I_{\text{Ca,T}}$ play distinct roles in pacemaker activity in vivo. Indeed, knockout of $\text{Ca}_v1.3$ channels reduces the basal and intrinsic heart rate in sedated conditions by approximately 20% and 60%, respectively,⁹ compared with the 10% reduction observed in mice lacking $\text{Ca}_v3.1$ channels in both freely moving and block of ANS conditions. These observations suggest that $\text{Ca}_v3.1$ channels contribute to the setting of the basal heart rate but have less impact on the dynamic regulation of pacemaker activity by the ANS. The lack of a significant change in the variability of the RR intervals in $\text{Ca}_v3.1$ mice is consistent with this hypothesis.

We report that the slowing of the AV conduction in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice is caused by dysfunction in the excitability of

the AVN. Indeed, intracardiac recordings show a delay in the AH conduction time and AVERP, in the absence of a prolongation of the P wave, which indicates similar conduction velocities in atria from WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice. Consistently with ECGs and intracardiac recordings, we found no $I_{\text{Ca,T}}$ in atrial myocytes from WT mice. Also, AVN cells display $I_{\text{Ca,T}}$ related to $\text{Ca}_v3.1$ channels because it was no longer detectable in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice. We did not find significant changes in the HV, QRS, and QT intervals (see Figures 3 and 5 and supplemental Figure III), indicating that the lack of $\text{Ca}_v3.1$ channels does not affect conduction through the His–Purkinje fiber network or the ventricular muscle. This phenotype differs from that of $\text{SCN5A}^{+/-}$ mice,¹⁹ which shows prominent alteration of the P wave and the QRS complex duration,³⁰ stressing the importance of the cardiac

Telemetric ECG Parameters in Freely Moving WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ Mice

	Heart Rate (bpm)					ECG Parameters			
	Mean HR (24 hours)	Daytime Mean HR	Nighttime Mean HR	HR Minimum (40 seconds)	HR Maximum (40 seconds)	P Wave Duration (ms)	PQ Interval (ms)	QRS Interval (ms)	QT Interval (ms)
WT	578 ± 14	526 ± 11	630 ± 18	404 ± 8	775 ± 10	13 ± 1	32 ± 1	12 ± 1	56 ± 2
$\text{Ca}_v3.1^{-/-}$	524 ± 11	476 ± 13	571 ± 12	358 ± 18	742 ± 15	14 ± 1	35 ± 0	12 ± 0	52 ± 2
<i>P</i>	0.012	0.015	0.022	0.039	NS	NS	0.004	NS	NS

ECG parameters were set at a cycle length of 100 ms. WT, $N=6$; $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$, $N=6$. HR indicates heart rate.

I_{Na} in intraatrial and His–Purkinje conduction. Also in contrast with $SCN5A^{+/-}$, $Ca_v3.1^{-/-}$ mice do not present ventricular tachyarrhythmias. This $SCN5A$ -mediated I_{Na} can possibly compensate for the lack of $I_{Ca,T}$ in the His–Purkinje system.

Pacemaking in Ca_v3.1^{-/-} Mice

We describe that inactivation of Ca_v3.1 channels significantly prolongs the pacemaker cycle length in isolated SAN cells by reducing the slope of the diastolic depolarization, demonstrating the involvement of Ca_v3.1-mediated $I_{Ca,T}$ in the setting of the diastolic depolarization in mouse SAN cells. In an attempt to compare the physiological roles of Ca_v3.1-mediated $I_{Ca,T}$ with that of Ca_v1.3-mediated $I_{Ca,L}$ and I_{Na} , we have developed a numerical model of mouse SAN electrophysiology based on previous studies on mouse SAN pacemaking in normal and genetically modified mouse strains (see supplemental Figures IV and V). Our numerical simulations indicate that Ca_v3.1 channels contribute to pacemaking by activating during the diastolic depolarization for more negative voltages than TTX-sensitive I_{Na} and Ca_v1.3-mediated $I_{Ca,L}$ (see supplemental Figure VB and VE). As a consequence, Ca_v3.1 channels can accelerate the diastolic depolarization rate in a voltage range in which I_{Na} is still not activated. This property can explain, at least in part, how Ca_v3.1 channels can contribute to pacemaking in spite of their relatively low availability at SAN diastolic potentials. An expanded discussion about the development, the features and limitations of our numerical model, and the physiological significance of Ca_v3.1-mediated $I_{Ca,T}$ compared with that of $I_{Ca,L}$ and I_{Na} is available in the online data supplement.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that Ca_v3.1 channels contribute to the heartbeat by influencing pacemaking and the AV conduction. To date, the presence of T-type channels in human heart is poorly documented. Molecular analyses, such as dot blots and Northern blots of human heart mRNAs, have identified transcripts for Ca_v3.1 and Ca_v3.2.^{31,32} T-type channels may play a role in the human SAN and the conduction system. For instance, the causality between congenital heart block induced by maternal autoantibodies against T-type channels and children showing SAN bradycardia and atrioventricular block has recently been documented.³³ There is growing evidence that T-type channels may constitute a promising pharmacological target for the treatment of human diseases, such as epilepsy and chronic pain.³⁴ From our observations, T-type channel inhibition would have no deleterious consequences in cardiac physiology. It is, therefore, tempting to speculate that selective blockers of Ca_v3.1 channels may hold promise for the therapeutic management of the cardiac diseases that require moderate heart rate reduction, such as cardiac ischemia and coronary heart disease.

Acknowledgments

This work was supported by the Association Française Contre les Myopathies, the Action Concertée Incitative (Developmental Biology and Integrative Physiology) of the French Ministry for Education, the Fondation de France, and the Chemoinformatics Program of Korean Institute of Science and Technology, Korea. A.T. is sup-

ported by a fellowship from the CNRS Lebanon. We are grateful to Patrick Atger for excellent technical assistance.

References

- Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev*. 1993;73:197–227.
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*. 2000;47:658–687.
- DiFrancesco D. Serious workings of the funny current. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;90:13–25.
- Lakatta EG, Maltsev VA, Bogdanov KY, Stern MD, Vinogradova TM. Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance. *Circ Res*. 2003;92:e45–e50.
- Honjo H, Inada S, Lancaster MK, Yamamoto M, Niwa R, Jones SA, Shibata N, Mitsui K, Horiuchi T, Kamiya K, Kodama I, Boyett MR. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release is not a dominating factor in sinoatrial node pacemaker activity. *Circ Res*. 2003;92:e41–e44.
- Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther*. 2005;107:59–79.
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 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*. 2003;100:15235–15240.
- Verheijck EE, van Ginneken AC, Wilders R, Bouman LN. Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am J Physiol*. 1999;276:H1064–H1077.
- Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS, Chiamvimonvat N. Functional Roles of Ca_v1.3 α_{1D} calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res*. 2002;90:981–987.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5543–5548.
- Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca²⁺ release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ Res*. 2002;90:73–79.
- 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*. 2004;559:835–848.
- Baruscotti M, DiFrancesco D, Robinson RB. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol*. 1996;492:21–30.
- 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 U S A*. 2003;100:3507–3512.
- 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*. 2005;567:387–400.
- Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol*. 1996;493:801–818.
- Yuill KH, Hancox JC. Characteristics of single cells isolated from the atrioventricular node of the adult guinea-pig heart. *Pflugers Arch*. 2002;445:311–320.
- Efimov IR, Nikolski VP, Rothenberg F, Greener ID, Li J, Dobrzynski H, Boyett M. Structure-function relationship in the AV junction. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;280:952–965.
- 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 U S A*. 2002;99:6210–6215.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol*. 1988;395:233–253.
- Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol*. 2000;524:415–422.

22. Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_h) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res*. 2001;52: 51–64.
23. Hirano Y, Fozzard HA, January CT. Characteristics of L- and T-type Ca^{2+} currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol*. 1989;256: H1478–H1492.
24. Tseng GN, Boyden PA. Multiple types of Ca^{2+} currents in single canine Purkinje cells. *Circ Res*. 1989;65:1735–1750.
25. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev*. 2003;83:117–161.
26. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking α_{1G} T-type Ca^{2+} channels. *Neuron*. 2001;31:35–45.
27. Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α_{1H} . *Biophys J*. 1999;77:3034–3042.
28. Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman A, Charpentier F, Escande D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: pharmacological profile. *Cardiovasc Res*. 2001; 50:328–334.
29. Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. Abnormal coronary function in mice deficient in α_{1H} T-type Ca^{2+} channels. *Science*. 2003;302:1416–1418.
30. Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;111:1738–1746.
31. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E. Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res*. 1998;83:103–109.
32. Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J. Molecular and functional properties of the human α_{1G} subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2000;275:6090–6100.
33. Hu K, Qu Y, Yue Y, Boutjdir M. Functional basis of sinus bradycardia in congenital heart block. *Circ Res*. 2004;94:e32–e38.
34. Birch PJ, Dekker LV, James IF, Southan A, Cronk D. Strategies to identify ion channel modulators: current and novel approaches to target neuropathic pain. *Drug Discov Today*. 2004;9:410–418.

Expanded Material and Methods

Mice handling was done in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996), and European directives (86/609/CEE) and every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used.

Results are presented as the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM); n indicates the number of observations. Statistical significance was assessed by the unpaired Student's *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant and n.s. stands for not significant. *N* indicates the number of mice used in indicated experiments.

Electrophysiology on isolated SAN, AVN and RA and cells

SAN tissue samples and pacemaker cells were isolated from age- and sex-matched 129 sv WT or Cav3.1^{-/-} adult mice as previously described ¹. Myocytes from the right atrium were isolated using a similar procedure as described for SAN cells. The AVN was identified by using landmarks as in ². Individual AVN cells were isolated by applying the same digestion/dissociation procedure as for SAN cells. Ca²⁺ currents were recorded at 26°C with the conventional whole-cell patch-clamp technique using extracellular 2 mM Ca²⁺ and analyzed as described previously ³. The cell access resistance in these recording conditions was around 10 MΩ, series resistance was evaluated at the peak of *I_{Ca}* and could be corrected up to 75%. Capacitative transients were not compensated electronically. Ca²⁺ currents were recorded using an extracellular solution containing (in mmol/L): TEA-Cl, 130; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; 4-amino-pyridine, 10; HEPES, 25; (adjusted to pH 7.4 with TEAOH). Whole-cell pipettes were filled with a solution containing (mM) CsCl, 130; EGTA, 10; HEPES, 25; Mg-ATP 3 and Na-GTP 0.4 (pH at 7.2 with CsOH). Pacemaker activity of SAN cells was

recorded at 35°C under perforated-patch conditions using β -escin⁴ into the pipette solution at a final concentration of 30 μ M. The pipette solution was (in mmol/L): KCl, 130; NaCl, 10; ATP- Na^+ salt, 2; creatine phosphate, 6.6; GTP- Mg^{2+} , 0.1; CaCl_2 , 0.04 (pCa 5.7); Hepes-KOH, 10; (adjusted to pH 7.2 with KOH). The extracellular solution contained (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 1; Hepes-NaOH, 5; and D-glucose, 5.5; (adjusted to pH 7.4 with NaOH). Myocytes from the RA were isolated using a similar procedure as described above and according to a previous study⁵. All voltage values were corrected for the appropriate liquid junction potential. All electrophysiological data were recorded and analyzed using the pCLAMP suite ver 9.0 (Axon Instruments).

Electrocardiograms (ECGs) on anesthetized mice

Adult mice were anesthetized with etomidate (30 mg/kg i.p.). Body temperature was maintained at 36°C-37°C with a warming pad controlled by a rectal temperature probe. Surface ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.7, EMKA Technologies). ECG channels were filtered between 0.5 and 250 Hz. Reported measurements were averaged from 3 consecutive PQRST complexes in lead I. Criteria used for interval measurements have been described elsewhere⁶. The QT interval was corrected for heart rate using the formula, $\text{QTc} = \text{QT}/(\text{RR}/100)^{1/2}$ established for mice with QT and RR expressed in ms⁷. ECGs were first recorded under baseline conditions and then 10 min after atropine sulfate (0.5 mg/kg i.p.) and propranolol (1 mg/kg i.p.) injection to block the autonomic nervous system (ANS).

Intracardiac recording and pacing.

Mouse preparation. Animals were anesthetized with an intra-peritoneal injection of etomidate (8 mg/kg) and pentobarbital (30 mg/kg). Body temperature was maintained at 36°C-37°C with a warming pad controlled by a rectal temperature probe. Under sterile conditions, an octapolar 2F catheter with an electrode spacing of 0.5 mm (Cordis Webster®) was introduced into the right atrium and ventricle through the right internal jugular vein. Using this catheter, simultaneous atrial and ventricular pacing and recording were performed. His bundle activity was also recorded when detected. Intracardiac electrograms were filtered between 30 and 500 Hz. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded to a computer through an analog to digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies) for monitoring and off-line analysis and measurement. Intracardiac pacing was performed with a Biotronik® UHS20 stimulator, modified by the manufacturer to pace at short coupling intervals.

Electrophysiological study protocols. Standard pacing protocols were used to determine the electrophysiologic parameters. Sinus node function was evaluated by measuring the rest sinus cycle length and the sinus node recovery time. After a period of normal sinus rhythm (RR interval values of 109 ± 5 ms for WT and 120 ± 9 ms for $Ca_v3.1^{-/-}$ mice; NS; $n=9$ and 7 respectively), atrial pacing was applied for a period of 30 s at cycle lengths of about 80% of the intrinsic sinus cycle length ($78\% \pm 2\%$ in WT mice, $n = 9$; $77\% \pm 1\%$ in $Ca_v3.1^{-/-}$ mice, $n = 7$; NS). For each pacing cycle length, sinus node recovery time (SNRT) was determined as the longest pause from the last paced atrial depolarization to the first sinus return cycle. Here we report cSNRT corrected by subtracting the intrinsic sinus cycle length from the recovery interval). Anterograde AV nodal conduction properties were assessed by pacing the atrium at rapid rates and determining the maximum cycle length resulting in Wenckebach phenomenon.

Refractory periods were determined by delivering an 8-stimulus drive train (S1) at a cycle length of 100 ms followed by a premature stimulus (S2) progressively decremented in 2 ms intervals. Atrial, atrioventricular nodal and ventricular effective refractory periods (AERP, AVERP and VERP, respectively) were defined as the longest S1-S2 coupling interval for each region that failed to generate a propagated beat with S2.

ECG recording in conscious mice

For long-term ECG recording, adult male mice were anesthetized with etomidate (35 mg/kg i.p.). A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20, Data Sciences International) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax (chest bipolar ECG lead). Local anesthesia was obtained with lidocaine (1%) injected subcutaneously at the sites of electrodes and transmitter implantation. Experiments were initiated at least 8 days after recovery from surgical implantation. Mice were housed in individual cages with free access to food and water and were exposed to 12-hour light/dark cycles (light, 8:30 AM to 8:30 PM) in a thermostatically controlled room. ECG signals were computer-recorded with the use of a telemetry receiver and an analog-to-digital conversion data acquisition system for display and analysis by DataquestTM A.R.T.TM software (Data Sciences International). Heart rate values were determined from RR intervals averaged every 10 seconds. Mean heart rate values were obtained in each mouse for an overall 24-hour period from 8:30 AM to 8:30 PM and for the corresponding 12-hour light and dark periods. Maximal and minimal heart rate values were determined on 40-second periods during dark and light periods respectively. ECG parameters were measured at a fixed RR interval of 100 ms with ECG Auto 1.5.7 software. Spectral analysis using a fast Fourier transformation algorithm on sequences of 512 points was performed using the ECG Auto 1.5.12.10 software (EMKA Technologies) on RR data series

recorded between 11 AM and 2 PM. The area under the curve was calculated for the ultra-low-frequency (ULF: 0 to 0.026 Hz), very-low-frequency (VLF: 0.026 to 0.32 Hz), low-frequency (LF: 0.32 to 1.2 Hz), and high-frequency (HF: 1.2 to 3.2 Hz) bands, as previously defined in the mouse species ⁸.

Measurements of the blood pressure

Systolic and diastolic blood pressures were measured on conscious mice using a computerized tail-cuff method (BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC). Following a 7-day acclimation period, mice were trained for 6 days on the equipment prior performing measurements. Animals were maintained restrained at 37°C in the dark and tail cuffs were placed on the tail of each of the mice. In order to acclimate the mice, 10 preliminary measurements were performed. Blood pressure was then determined and recorded. Mice were tested over 3 days and 10 measurements per day were collected. The final systolic blood pressure value was calculated as the average of 30 measurements.

RT-PCR Analysis

For RT-PCR analysis, total RNAs from sino-atrial node (SAN), the right atrium (RA), the left ventricle (LV) and the atrio-ventricular node (AVN) adult mice were extracted using the SNAP™ Kit (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was performed with total RNA using random primers and Superscript II RNase H reverse transcriptase (Invitrogen). Following RT, the cDNAs for Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3 were amplified using the following set of primers : Ca_v3.1-F 5'-GTCTCCGCACGGTCTGTAAC-3' (NM_009783, nucleotide (nt) 329), Ca_v3.1-R, 5'-CCACAGCAAAGAAGGCAAAG-3' (nt 499, expected size 170bp), Ca_v3.2-F 5'-TGGGAACGTGCTTCTTCTCT-3' (NM_021415, nt 690), Ca_v3.2R,

GGGGATGTGTGAGCATTTCT (nt 918, expected size 228bp), Ca_v3.3-F 5'-GACACCACTCCCCACACACT-3'(XM_139476, nt 3250), Ca_v3.3-R, CCTCCTGTTCTCCTCCTTC-3' (nt 3487, expected size 237 bp). PCR was performed in a final volume of 25 µl containing 2 µl of reverse transcription reaction, 10 pmol of each primer, 2.5 mM each dNTP (Pharmacia), 1.5 mM MgCl₂ and 1 unit of Taq polymerase (Sigma) in a MJ Research, Inc Thermal Cycler with the following cycling protocol: after 3 min at 94°C, 35 cycles (94°C, 45s; annealing temperature, 45s; 72°C, 35s) of PCR were performed followed by a final elongation period of 10 min at 72 °C. Annealing temperatures were as follows: 57°C for Ca_v3.1, 55°C for Ca_v3.2 and 59°C for Ca_v3.3. To visualize the presence and size of the amplified fragments, 10 µl of the PCR products were electrophoretically separated on an ethidium bromide-stained 2% agarose gel.

Quantitative RT-PCR

Ca_v3 mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR using a real time TaqMan PCR technology (ABI Prism 7000, Applied Biosystems) using the following sets of specific primers for Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3 and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) : Ca_v3.1 : Q-Ca_v3.1-F 5'-CCAAGCAACGGGAGAGTCA-3' (NM_009783, nt 1310) and Q-Ca_v3.1-R 5'-GCTAGCATTGGACAGGAATCG-3' (nt 1371, expected size 61bp) ; Ca_v3.2 : Q- Ca_v3.2-F 5'-CAGCGGCTACGCCTATGC-3'(NM_021415, nt 3230) and Q-Ca_v3.2-R 5'-CAAAAGAGTGTGGGCCATGTC-3'(nt 3294, expected size 65bp) ; Ca_v3.3 : Ca_v3.3-F 5'-CCTTTTTGCTCTTGTGTTTTTCTG-3' (XM_139476 nt 1106), Ca_v3.3-R 3'-ACTTTAGGGAGGCATCATTAATATTCC-3' (nt 1219, expected size 113bp) and HPRT : Q-HPRT-F 5'- GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3' (NM_013556, nt 540), and Q-HPRT-R 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' (nt 591, expected size 51bp). Experiments were performed using 1X SYBR Green PCR Master Mix TaqMan PCR buffer from Applied

Biosystems and 300 nM of each primer. The cycling conditions included a hot start for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. All primers sets were tested under the Taqman PCR conditions using mouse genomic DNA as template. In all cases, the presence of a single product of the appropriate size was controlled by agarose gel electrophoresis (Figure 2B). Each amplification was normalized to HPRT, the reference mRNA. mRNA samples that were incubated without reverse transcriptase during cDNA synthesis showed no amplification (negative controls).

Numerical modelling of mouse SAN cell pacemaker activity

Numerical modelling of pacemaker activity was performed according to the central SAN model by Zhang et al.⁹. We have chosen this model since it fairly reproduces basal pacemaking in spite of the absence of experimental data on intracellular ionic concentration and homeostasis, which is in fact the case for mouse SAN pacemaker activity. Also, this model has been developed to account for pacemaking in small cells likely from the center of the node and having similar capacitance than that used in our study (21 pF). The original SAN model has been appropriately modified in accordance to experimental data obtained by different groups in mouse pacemaker cells. To this aim, we have added equations to account for the presence of $\text{Ca}_v1.3$ - and $\text{Ca}_v1.2$ - mediated $I_{Ca,L}$, according to previous studies on $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice^{3,10}. These current components have been separated with respect to their differential steady state parameters for activation and inactivation. Similarly, TTX- sensitive and TTX- insensitive I_{Na} currents have been included in the model according to experimental results on isolated mouse SAN cells by Lei et al.¹¹. $\text{Ca}_v3.1$ - mediated $I_{Ca,T}$ was modelled to match voltage clamp results obtained in Fig. 1 and in ref.³. Also, equations for the I_{K1} and I_{st} were added according to a previous report on mouse SAN cells¹².

Numerical simulations were performed by employing the XPPAUT software, freely available at <http://www.pitt.edu/~phase/>. Due to the absence of experimental data from mouse SAN

cells, all equations and parameter values for background voltage-independent currents, ionic pumps and exchangers were kept as in the original model of rabbit central SAN cells ⁹ (see also the online supplementary table 1). The complete list of parameter values and experimental current densities used for simulations are shown in the online supplementary table 1 and 2, respectively. The list of initial values is shown in the online supplementary table 3.

Modelling of $I_{Ca,T}$

A Hodgkin-Huxley (HH) model of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ was constructed according to the equations described in Destexhe & Huguenard ¹³. Steady state parameters for activation were taken from our $I_{Ca,T}$ records in SAN cells from WT mice. Steady-state inactivation parameters of $I_{Ca,T}$ were from our previous study on SAN cells from $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice ³ which allow precise measurement of $I_{Ca,T}$ at negative test potentials (see also ref. ¹⁴). Activation and inactivation time constants were measured in sample records from WT mice at 36 °C (data not shown) and compared with records of $I_{Ca,T}$ from $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice ³. For $I_{Ca,T}$ reactivation kinetics, we used experimental records obtained from recombinant $\text{Ca}_v3.1b$ channels ¹⁵ which are expressed in the heart ^{16,17} and show the greatest similarity in steady state properties with the native mouse SAN $I_{Ca,T}$.

Modelling of $I_{Ca,L}$, I_{Na} and I_{st}

For modelling of $I_{Ca,L}$, we have used the same equations as in Zhang et al ⁹. According to experimental evidence from SAN cells of $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ mice, we have assumed that the total whole-cell $I_{Ca,L}$ is composed by both $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v1.2$ channels. Two independent groups of equations were used for $\text{Ca}_v1.3$ - and $\text{Ca}_v1.2$ -mediated $I_{Ca,L}$. Activation and inactivation steady-state parameters used in the model, as well as current densities of $\text{Ca}_v1.3$ - and $\text{Ca}_v1.2$ -

mediated $I_{Ca,L}$ are from our previous study on $Ca_v1.3^{-/-}$ mice ³. For modelling I_{Na} , we have used equations as in the atrial cell model by Nygren and co-workers ¹⁸. We have assumed that the total whole-cell I_{Na} is composed by TTX-sensitive (I_{NaS}) and TTX-resistant (I_{NaR}) I_{Na} according to Lei et al ¹¹. Steady-state activation/inactivation parameters as well as the relative current densities of I_{NaS} and I_{NaR} for a SAN cell of 21 pF are from Fig. 3F and 2K in Lei et al, ¹¹ respectively. The I_{st} current was also added in our model. To this aim we have employed the HH empirical model of I_{st} from Shinagawa et al ¹⁹. I_{st} densities and activation are from mouse SAN cells according to ref. ¹².

Modelling of K^+ currents and I_f

All voltage-dependent K^+ currents included in the original model by Zhang et al. have been included in our calculations, except for I_{K1} , that we have added to account for the observed I_{K1} in mouse SAN cells ¹². I_{K1} was calculated according to equations in Nygren et al. ¹⁸ I_{K1} density was taken from Cho et al. ¹². For modelling of I_{Kr} , we used the equations from Kurata et al. ²⁰. These equations, fairly reproduced experimental results on mouse SAN pacemaker cells published in Clark et al ²¹. The conductance of all other voltage-dependent K^+ currents included by Zhang et al., have been kept as in the original model of rabbit central SAN cells (see online supplementary table 1). For I_f , we used the same equations as in Zhang et al. To account for mouse SAN cells, I_f density and activation were adjusted according to experimental results by Mangoni & Nargeot ¹.

Simulation of mouse pacemaker activity

We have developed a model of mouse SAN electrophysiology to gain insights into the behaviour of $I_{Ca,T}$ during pacemaking (supplementary Figure 4, 5). To this aim, we have adapted the model for central SAN cells by Zhang and co-workers ⁹ to account for published

data on isolated mouse SAN cells ionic conductances (see the Methods section). The model takes into account the expression of $\text{Ca}_v1.3$ - and $\text{Ca}_v1.2$ -mediated $I_{\text{Ca},L}$,^{3,10} as well as TTX-sensitive and TTX-resistant I_{Na} ¹¹. The model also includes I_{st} current according to a recent study on mouse SAN cells by Cho and coworkers¹². I_{Kr} was also modelled to account for experimental data in Clark et al²¹. I_{Kl} was also included in the model, since this current has been consistently found in mouse SAN cells¹² (M. Mangoni, unpublished observations. As shown in supplementary Figure 4A, our model fairly reproduces current densities and waveforms experimentally observed in voltage-clamp conditions. $I_{\text{Ca},T}$ density and voltage dependence was set according to experimental parameters (Figure 1B). The density of $\text{Ca}_v1.3$ -mediated $I_{\text{Ca},L}$ was set to 10 pA/pF (see supplementary table 2). This value is higher than that found experimentally in this study (5-6 pA/pF, see Figure 1). We have preferred to assume similar densities for $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v1.3$ -mediated currents since $\text{Ca}_v1.3$ channels are already partially inactivated at a H_p of -55 mV³ (see supplementary Figure 4B), leading to a possible underestimation of the absolute $I_{\text{Ca},L}$ density compared to $I_{\text{Ca},T}$ in voltage-clamp conditions. Furthermore, $I_{\text{Ca},L}$ densities higher than 6 pA/pF can be found on isolated SAN cells and activation of the β -adrenergic receptor strongly stimulates $\text{Ca}_v1.3$ - and $\text{Ca}_v1.2$ -mediated $I_{\text{Ca},L}$ ³. As to TTX-sensitive and TTX-resistant I_{Na} , our modelling work reproduced the data by Lei and co-workers¹¹. Steady-state voltage dependencies for activation and inactivation of both I_{Na} current components are shown in the supplementary Figure 4C. The density of TTX-sensitive I_{Na} was chosen to match that in reported action potential clamp experiments, thereby yielding a current amplitude between 10 and 20 pA (20 pA in our simulations) during the diastolic depolarisation (see Figure 3E of ref.¹¹). The density of TTX-resistant I_{Na} was set as for cells having capacitance of 30 pF in Lei et al.¹¹. This density has been measured in low- Na^+ conditions. This can lead to some underestimation of TTX-resistant I_{Na} in our calculations even if the presence of this current in SAN cells of less than 30 pF has not been

directly demonstrated. However, it was necessary to include TTX-resistant I_{Na} , since it has been demonstrated that $SCN5A^{+/-}$ mice show moderate bradycardia²² and that TTX-resistant I_{Na} participate to the setting of the normal SAN function¹¹.

When parameters in supplementary table 1 are applied, the model generates a basal rate of 278 bpm (cycle length is 216 ms, Supplementary Figure 5A), with a MDP of -65 mV and a takeoff potential of about -45 mV. Abolition of $Ca_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ from the model induced 8% rate reduction, by slowing the diastolic depolarisation. Upon deactivation of large I_{Kr} , I_f is the first voltage-dependent inward current to activate in the diastolic depolarisation (supplementary Figure 5C), I_{st} is also present in the same range of voltages and drives a residual fraction of current which has not completely deactivated after repolarization (supplementary Figure 5D). $Ca_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ starts to activate at about -60 mV and peaks at -40 mV (supplementary Figure 5D, E). As a comparison, TTX-sensitive I_{Na} activates during the late phase of the diastolic depolarisation at about -50 mV and peaks around -30 mV (supplementary Figure 5E). This observation is consistent with the behaviour of TTX-sensitive I_{Na} in action potential clamp experiments (see Figure 3 E, F in Lei et al.¹¹ and the related discussion). Our simulations predict that $Ca_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ can contribute to the diastolic depolarisation by activating earlier than the fast TTX-sensitive and TTX-resistant I_{Na} . (supplementary Figure 5B). The negative activation range of $Ca_v3.1$ -related $I_{Ca,T}$ indicate that TTX-sensitive I_{Na} cannot compensate for the lack of $I_{Ca,T}$ in $Ca_v3.1^{-/-}$ mice, at least under basal conditions. $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ is predicted to be present throughout the diastolic depolarisation phase (supplementary Figure 5B, D). This persistent component is likely to be due to both slow inactivation kinetics of $Ca_v1.3$ channels and/or to the predicted window $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ (supplementary Figure 4B). Incomplete inactivation of $Ca_v1.3$ -mediated $I_{Ca,L}$ has also been observed upon application of pacemaker action potential waveforms to HEK cells expressing recombinant human $Ca_v1.3$ channels¹⁴. This persistent $I_{Ca,L}$ component

contribute to the diastolic depolarisation by summing to $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$, I_{st} as well as to both TTX-sensitive and -resistant components of I_{Na} close to the cell takeoff potential. For this reason, $\text{Ca}_v1.3$ -related $I_{Ca,L}$ is the major voltage-dependent Ca^{2+} current contributing to mouse SAN pacemaking. In our model, I_{st} is activated in the same voltage range as $I_{Ca,T}$. Together with $\text{Ca}_v1.3$ -related $I_{Ca,L}$, I_{st} is strongly sensitive to β -adrenergic agonists¹². These currents can thus constitute two major mechanisms of compensation of the lack of $\text{Ca}_v3.1$ channels at maximal heart rates which is presumably driven by strong β -adrenergic input on the SAN (see table1). Compared to $\text{Ca}_v1.3$ and TTX-sensitive channels, $\text{Ca}_v3.1$ channels are strongly inactivated at positive MDPs. We can expect that the relative contribution of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ to pacemaking will depend upon the cell MDP as well as the degree of stimulation of currents by the β -adrenergic/cAMP-dependent signalling pathway. Accordingly, switching the model MDP to more positive voltages (supplementary Figure 5F), reduces the effect of $I_{Ca,T}$ abolition on the calculated pacing rate.

We have also directly measured in SAN cells the level of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ at a test potential of -50 mV from different HP ranging from -70 to -55 mV. To this aim, we have employed WT SAN cells in which $I_{Ca,L}$ did not show detectable activation at -50 mV. In these conditions, averaged $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ peak (isochronal) densities were 0.66 ± 0.3 pA/pF from a HP of -65 mV, 0.18 ± 0.065 pA/pF from a HP of -60 mV and 0.044 ± 0.026 from a HP of -55 mV (N=2, n=5, peak $I_{Ca,T} = 7.5 \pm 2$ pA/pF at -30 mV, $H_p = -90$ mV). As a comparison, our model predicts in voltage-clamp conditions 1.9 pF peak $I_{Ca,T}$ from a HP of -65 mV, 0.47 pA/pF from a HP=-60 mV and 0.11 pA/pF from HP=-55 mV ($I_{Ca,T}$ peak density 10 pA/pF).

Interest of the model study

The development of a numerical model of mouse SAN electrophysiology based on experimental data coming from normal and genetically-modified mouse strains constitute an

important step toward understanding the physiological role and significance of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ compared to other ionic channels. The goal of our numerical simulations is to define the voltage range of activation as well as the relative level of $I_{Ca,T}$ during pacemaker activity with respect to other ionic currents involved in the genesis and regulation of automaticity. Calculations indicate that $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ can contribute to the diastolic depolarisation by activating early in the diastolic depolarisation phase together with I_{st} . The contribution of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ to overall pacemaking is predicted to be moderate, an observation which is experimentally verified. Our calculations are thus also important for indicating how $\text{Ca}_v3.1$ channels can contribute to the diastolic depolarisation in spite being partly inactivated at positive MDPs. The physiological significance of $\text{Ca}_v3.1$ -related $I_{Ca,T}$ can also be linked to the presence of large deactivating I_{Kr} at the end of repolarization. Indeed, the presence of $I_{Ca,T}$ can favour the development of the diastolic depolarisation in a voltage range in which large outward K^+ currents are still present. In our numerical model, we did not observe a change in the upstroke phase upon abolition of $\text{Ca}_v3.1$ -related $I_{Ca,T}$ (supplementary Figure 5A). Consistently with the work of Lei et al.¹¹, abolition of TTX-sensitive and resistant I_{Na} affected the SAN rate, as well as the takeoff potential and the upstroke phase in our simulations (not shown). These observation indicate that $\text{Ca}_v3.1$ -related $I_{Ca,T}$ and I_{Na} play complementary and distinct roles in mouse SAN pacemaking.

Each numerical model of pacemaking has its internal limitations. In our model, limitations are linked to the assumption that internal Ca^{2+} concentration remains constant and to the available data on mouse SAN automaticity. Indeed, even if detailed modelling of diastolic release of Ca^{2+} have been developed for rabbit SAN cells²³, no quantitative experimental data are available on this newly described pacemaker mechanism in mouse SAN cells. Consequently, inclusion of RyR-dependent Ca^{2+} release in our model would be based only on assumptions about parameters scaling. To this respect, the basal calculated rate is about half than that

observed in freely-moving mice (table1). This discrepancy can be in part ascribed to I_{Kr} density that has been set to account for data coming from larger cells and to the inclusion of I_{Ks} and I_{sus} in the model. Furthermore, our model does not include diastolic release of Ca^{2+} which has been shown to strongly accelerate the diastolic depolarisation rate in rabbit SAN cells ^{24,25} and in numerical models of pacemaking ^{23,26}. Finally, the basal adrenergic tone *in vivo* which stimulates $I_{Ca,L}$, I_f , I_{st} and diastolic Ca^{2+} release beyond their basal levels can also explain the difference between the basal model rate and that observed in freely-moving mice. The lack of experimental data on diastolic Ca^{2+} release in mouse SAN cells also prevented us to get insights into pacemaking during activation of the β -adrenergic receptor. Nevertheless, our model can be updated as new experimental data on mouse SAN will be available.

The observation that the reduction of pacing rate is higher in SAN cells from $Ca_v3.1^{-/-}$ mice (see Figure 4 A, B) than that predicted in our simulations suggests that the contribution of $Ca_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ to the diastolic depolarisation may also be linked to intracellular Ca^{2+} signalling. Indeed, Huser et al. ²⁷ have reported that in latent pacemaker cells, T-type channels could trigger Ca^{2+} release, since diastolic Ca^{2+} sparks were generated in a voltage range compatible with T-type channel activation and were blocked by 50 μM Ni^{2+} . This view has been challenged in a recent work on diastolic Ca^{2+} release in primary rabbit SAN pacemaker cells ²⁵ in which no change in Ca^{2+} sparks were reported in the presence of 30 μM Ni^{2+} . The fact that $Ca_v3.1$ channels are only partly inhibited at 50 μM Ni^{2+} indicate the necessity to investigate if SAN $Ca_v3.1$ channels are coupled to Ca^{2+} release during diastolic depolarization in the mouse SAN. On the other hand, a species-dependent influence on the functional expression of $Ca_v3.2$ in the adult heart cannot be excluded. For instance it has been reported that $I_{Ca,T}$ was strongly inhibited by 50 μM Ni^{2+} in cat latent pacemaker cells ²⁷, thus rising the possibility of functional $Ca_v3.2$ channels in these cells.

References cited in the supplementary data:

1. Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res*. 2001;52:51-64.
2. 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*. 2005;562:223-234.
3. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5543-5548.
4. Fan JS, Palade P. Perforated patch recording with beta-escin. *Pflugers Arch*. 1998;436:1021-1023.
5. Leuranguer V, Monteil A, Bourinet E, Dayanithi G, Nargeot J. T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol*. 2000;279:H2540-2548.
6. Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman AF, Charpentier F, Escande D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant negative isoform. Part II: Pharmacological profile. *Cardiovasc Res*. 2001;50:328-334.
7. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*. 1998;274:H747-751.
8. Shusterman V, Usiene I, Harrigal C, Lee JS, Kubota T, Feldman AM, London B. Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol*. 2002;282:H2076-2083.
9. 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*. 2000;279:H397-421.
10. Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS, Chiamvimonvat N. Functional Roles of $\text{Ca}_v1.3 \alpha_{1D}$ calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res*. 2002;90:981-987.
11. 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*. 2004;559:835-848.
12. Cho H-S, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol*. 2003;550:169-180.
13. Destexhe A, Huguenard JR. Nonlinear thermodynamic models of voltage-dependent currents. *J Comput Neurosci*. 2000;9:259-270.
14. Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;90:38-63.
15. Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P. Alternatively spliced α_{1G} ($\text{Ca}_v3.1$) intracellular loops promote specific T-type Ca^{2+} channel gating properties. *Biophys J*. 2001;80:1238-1250.
16. Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J. Molecular and functional properties of the human α_{1G} subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2000;275:6090-6100.
17. Cribbs LL, Martin BL, Schroder EA, Keller BB, Delisle BP, Satin J. Identification of the t-type calcium channel ($\text{Ca}_v3.1d$) in developing mouse heart. *Circ Res*. 2001;88:403-407.

18. Nygren A, Fiset C, Firek L, Clark JW, Lindblad DS, Clark RB, Giles WR. Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of K^+ currents in repolarization. *Circ Res*. 1998;82:63-81.
19. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K^+ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol*. 2000;523:593-605.
20. Kurata Y, Hisatome I, Imanishi S, Shibamoto T. Dynamical description of sinoatrial node pacemaking: improved mathematical model for primary pacemaker cell. *Am J Physiol*. 2002;283:H2074-2101.
21. Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR. A rapidly activating delayed rectifier K^+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol*. 2004;286:H1757-1766.
22. 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*. 2005;567:387-400.
23. Maltsev VA, Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG, Stern MD. Diastolic calcium release controls the beating rate of rabbit sinoatrial node cells: numerical modeling of the coupling process. *Biophys J*. 2004;86:2596-2605.
24. Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na^+-Ca^{2+} exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res*. 2001;88:1254-1258.
25. 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*. 2004;94:802-809.
26. Lakatta EG, Maltsev VA, Bogdanov KY, Stern MD, Vinogradova TM. Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance. *Circ Res*. 2003;92:e45-50.
27. Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol*. 2000;524:415-422.
28. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking α_{1G} T-type Ca^{2+} channels. *Neuron*. 2001;31:35-45.
29. 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*. 2000;481:73-76.
30. Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:533-546.
31. Larsen JK, Mitchell JW, Best PM. Quantitative analysis of the expression and distribution of calcium channel α_1 subunit mRNA in the atria and ventricles of the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:519-532.
32. Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. $Ca_v3.2$ subunit underlies the functional T-type Ca^{2+} channel in murine hearts during the embryonic period. *Am J Physiol*. 2004;286:H2257-2263.

Online Supplementary Figure Legends

Online supplementary Figure 1 :

No difference in capacitance and cell morphology between WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ cardiac cells. Electrophysiological recordings of SAN cells from WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice animals showed no change in the cell capacitance (19 ± 2 pF N=13, n=17 and 20 ± 1 pF N=12, n=18, respectively). Consistently, the averaged upstroke velocities in action potentials recorded (see Fig. 4 in the main text) were 20 ± 5 V/S (N=5, n=14) and 21 ± 5 V/S, (N=4, n=15) in SAN cells from WT and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice. These values are consistent with the leading mouse SAN pacemaker cells presumably from the center of the SAN. In addition, no difference in their morphology could be identified (**supplementary Figure 1A**). Similarly, inactivation of $\text{Ca}_v3.1$ induce no change in capacitance for AVN cells (17 ± 1 pF N=5, n=7 and 18 ± 4 pF, N=4, n=7; **supplementary Figure 1B**) and for RA cells (33.3 ± 1.4 pF and 32.7 ± 2.3 pF N=3, n=8; **supplementary Figure 1C**).

Online supplementary Figure 2.

Expression of T-type Ca^{2+} channel isotype mRNAs in wild-type (+/+) and $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (-/-) mouse heart. Transcripts for the $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ subunits, but not for the $\text{Ca}_v3.3$ subunit, were detected in the SAN, as compared to that obtained with hippocampus mRNA used as a positive control (**Supplementary Figure 2A**). The disruption of the $\text{Ca}_v3.1$ gene was assessed by using a set of primers overlapping from the first to the third exon. Expectedly, no $\text{Ca}_v3.1$ transcripts were detectable in $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ mice since the forward primer used to identify $\text{Ca}_v3.1$ transcripts was comprised within exon 1 that was deleted to generate a null allele for *cacna1g*²⁸. Because RT-PCR experiments indicated that $\text{Ca}_v3.1$ transcripts were present in

various cardiac tissues, real-time TaqMan PCR was developed to quantitatively analyze T-type channel mRNA expression levels in various cardiac areas : SAN, sino-atrial node ; AVN, atrioventricular node ; RA, right atrium ; LV, left ventricle (**Supplementary Figure 2B**). mRNA contents were normalized according to HPRT mRNA contents and the results are expressed as $2^{-\Delta Ct} \times 100$. Each value represents the mean of at least 6 experiments in triplicate out of 3 independent RT samples. The upper panel shows the corresponding gels (Mw : molecular weight). The highest amounts of $Ca_v3.1$ mRNA were detected both in the SAN and in the AVN, while the amount of $Ca_v3.1$ mRNA in the RA and in the LV was significantly lower. Real-time PCR also confirmed the absence of $Ca_v3.3$ mRNA in all cardiac tissues while $Ca_v3.2$ mRNA was detected in mouse cardiac tissues, especially in the RA. We found mRNAs for both $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ channels in the adult mouse SAN, AVN and the RA (see supplementary Figure 2). Our RT-PCR results are consistent with *in situ* hybridisation data describing lower $Ca_v3.2$ mRNA levels as compared to $Ca_v3.1$ ²⁹. Interestingly, several recent studies have revealed that after birth only $I_{Ca,T}$ related to $Ca_v3.1$ channels is detectable, while both $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ channels are expressed in the foetal heart ^{17,30-32}. These data suggest a developmental isotype switch in the mouse heart with embryonic $I_{Ca,T}$ corresponding to a mix of $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.1$ channels, while after birth only $Ca_v3.1$ channels would be functionally expressed.

Online supplementary Figure 3.

Relation between the QT and RR ECG intervals recorded in sedated WT (open circles) and $Ca_v3.1^{-/-}$ mice (filled circles). Each data point represents one mouse.

Online supplementary Figure 4.

Voltage-dependent properties of ionic currents calculated using the mouse SAN electrophysiology model. (A). Voltage clamp traces of voltage-dependent ionic currents (B). Activation and inactivation curves for $\text{Ca}_v3.1$ (d_T , f_T), $\text{Ca}_v1.3$ (d_{LD} , f_{LD}) and $\text{Ca}_v1.2$ (d_L , f_L) channels used in the model, as indicated in the panel legend. (C). Activation and inactivation curves for TTX-sensitive and TTX-resistant I_{Na} , as indicated in panel legend. Abbreviations used in panels B, C for gating variables are referred in supplementary table 3.

Online supplementary Figure 5.

Simulated mouse SAN action potentials and underlying ionic currents. (A). Effect of abolishing $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ on a simulated SAN action potential obtained with parameters indicated in supplementary tables 1-3. (B). Activation of $\text{Ca}_v3.1$ -mediated $I_{Ca,T}$ compared with $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.2$ and TTX-sensitive and resistant I_{Na} as indicated in the panel legend. (C). Activation during the pacemaker cycle of voltage-dependent K^+ currents, together with I_{K1} and I_f . (D). Current-to-voltage relationship of $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v1.2$ channels during the pacemaker cycle shown in (A). The predicted I_{st} current is also shown here. (E). Current to voltage relationships comparing $\text{Ca}_v3.1$ channels to TTX-sensitive and TTX-resistant I_{Na} as indicated in the panel legend, for the pacemaker cycle in (A). (F). Effects of $\text{Ca}_v3.1$ abolition in a simulated SAN action potential obtained by setting I_{K1} density to zero and by lowering the conductance of I_{Kr} to $0.0018 \mu\text{S}$.

Online Supplementary table 1.

Parameter values of the mouse SAN cell model. Generally, abbreviations are the same as in the original model by Zhang et al ⁹. Other abbreviations define the conductance of I_{st} (g_{st}) and that of I_{Kl} (g_{Kl}).

Abbreviation	Absolute value	Abbreviation	Absolute value
C_m	21 pF	$Pinac$	-15
d_{NaCa}	0.0001	$F_{K,r}$	0.4
$E_{Ca,L}$	46.4 mV	g_{to}	0.00049 μS
$E_{Ca,T}$	45 mV	g_{sus}	0.000065 μS
G_{Na} (TTX resistant)	7.5×10^{-7} μS	$g_{K,s}$	0.000518 μS
I_{Na} $V_{0.5act}$	-44 mV	$g_{f,Na}$	0.002 μS
I_{Na} $V_{0.5Inact}$	-65 mV	$g_{f,K}$	0.002 μS
G_{NaS} (TTX sensitive)	7.5×10^{-6} μS	$g_{b,Na}$	0.000058 μS
I_{NaS} $V_{0.5act}$	-29 mV	$g_{b,Ca}$	0.0000152 μS
I_{NaS} $V_{0.5Inact}$	-56 mV	$g_{b,K}$	0.0000252 μS
$g_{Ca,L}$	0.0022 μS	I_{pmax}	0.0478 nA
$I_{Ca,L}$ $V_{0.5act}$ ($Ca_v1.2$)	-3 mV	$K_{m,K}$	0.621
$I_{Ca,L}$ $V_{0.5Inact}$ ($Ca_v1.2$)	-28 mV	$K_{m,Na}$	5.64
$g_{Ca,D}$	0.0064 μS	γ_{NaCa}	0.5
$I_{Ca,D}$ $V_{0.5act}$ ($Ca_v1.3$)	-28 mV	k_{NaCa}	0.000027 nA
$I_{Ca,D}$ $V_{0.5Inact}$ ($Ca_v1.3$)	-48 mV	$[Na^+]_o$	140 mM
$g_{Ca,T}$	0.01 μS	$[Na^+]_i$	8 mM
$I_{Ca,T}$ $V_{0.5act}$ ($Ca_v3.1$)	-45 mV	$[Ca^{2+}]_o$	2 mM
$I_{Ca,T}$ $V_{0.5Inact}$ ($Ca_v3.1$)	-71 mV	$[Ca^{2+}]_i$	0.0001 mM
g_{st}	0.017 μS	$[K^+]_o$	5.4 mM
g_{Kl}	0.0009 μS	$[K^+]_i$	140 mM
$g_{K,r}$	0.0022 μS		

Online supplementary table 2.

Current densities. The table show the experimental ionic current densities used in modelling mouse SAN cell pacemaking. The test potential and the reference from which each value has been deduced are also shown.

Current	Density (pA/pF)	Test potential (mV)	Reference
I_{Na} (TTX resistant)	10	-20	11
I_{NaS} (TTX sensitive)	135	-20	11
$I_{Ca,L}$ ($Ca_v1.2$)	3.1	+10	3
$I_{Ca,LD}$ ($Ca_v1.3$)	10.4	-20	This study, see also ³
$I_{Ca,T}$	10.5	-30	This study
I_{st}	7.4	-30	12
I_{Kr}	2.1	-10	21
I_{K1}	6.2	-120	12
I_f	21	-120	1
I_{to}	15.45	+50	9
I_{sus}	0.54	+50	9
$I_{K,s}$	0.66	+40	9
$I_{b,Na}$	0.43	-100	9
$I_{b,K}$	0.002	-100	9
$I_{b,Ca}$	0.13	-100	9
I_{NaCa}	0.013	-100	9
I_p	0.098	-100	9

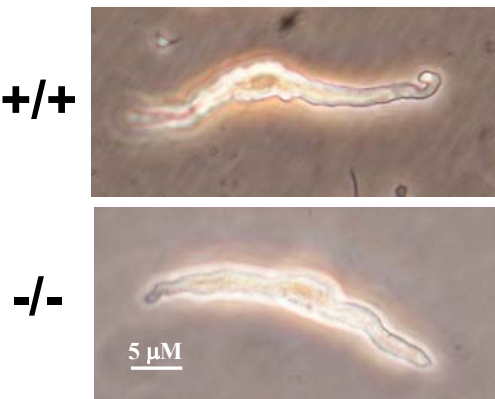
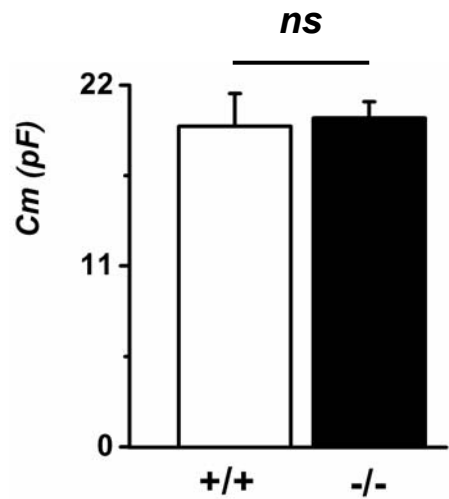
Supplementary table 3.

Model initial values. Abbreviations are defined as in the original model by Zhang et al ⁹. d_{LD} , f_{LD} , d_{st} , f_{st} are the activation and inactivation gating variables for the $Ca_v1.3$ and I_{st} current, respectively.

V_M (mV)	-60.1	d_T	0.02217
m	0.135	f_T	0.06274
h_1	0.03123	d_{st}	0.017
h_2	4.894	f_{st}	0.283
ms	0.135	y	0.0528
hs_1	0.03123	r	0.0197
hs_2	4.894	q	0.663
d_L	0.02248	n	0.0767
f_L	0.43	$p_{a,f}$	0.400
d_{LD}	0.02248	$p_{a,s}$	0.327
f_{LD}	0.531	p_i	0.991

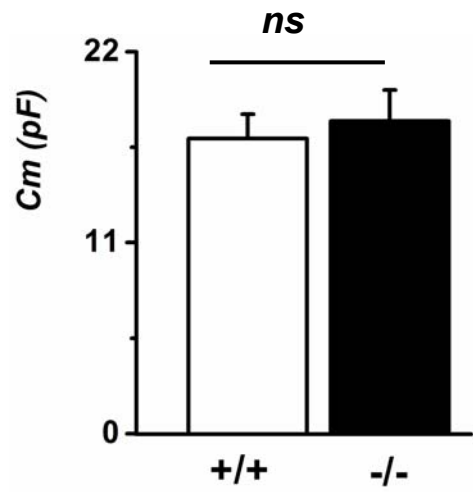
A

SAN :



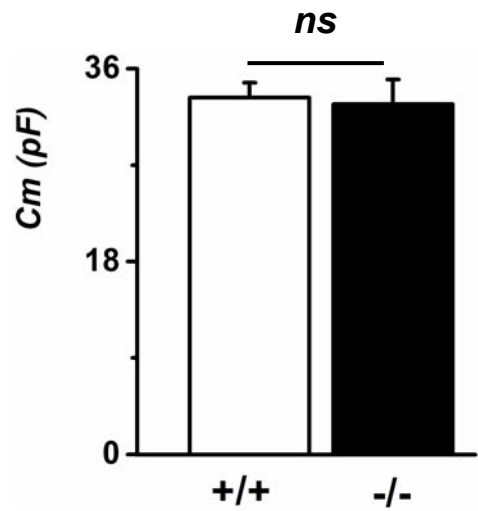
B

AVN :

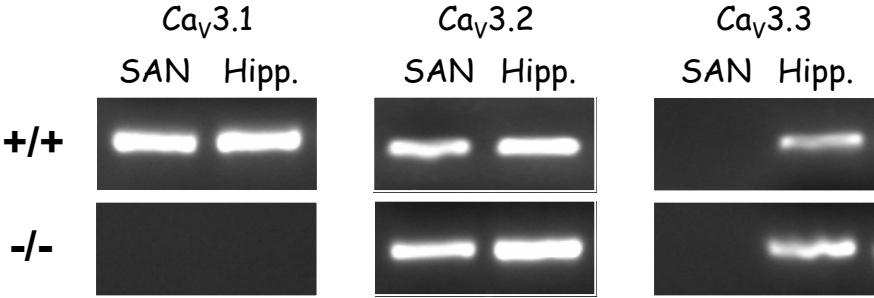


C

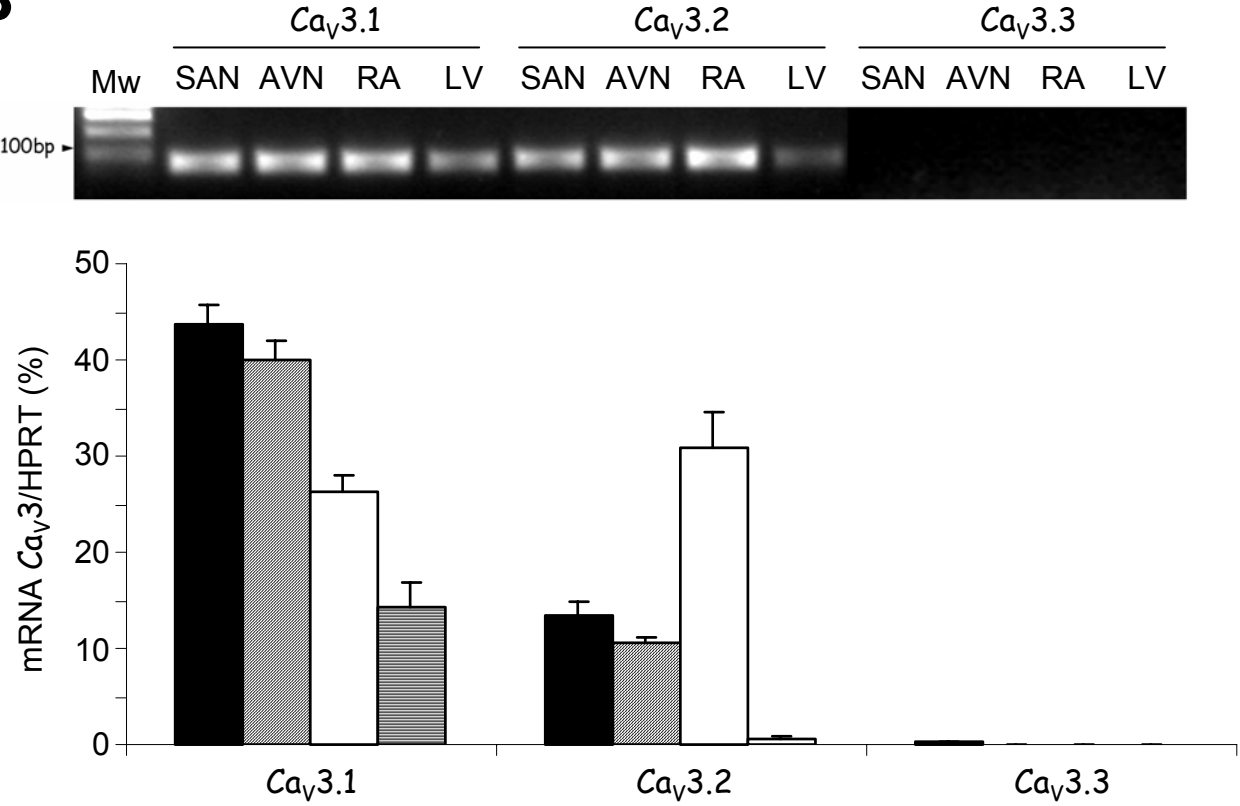
RA :

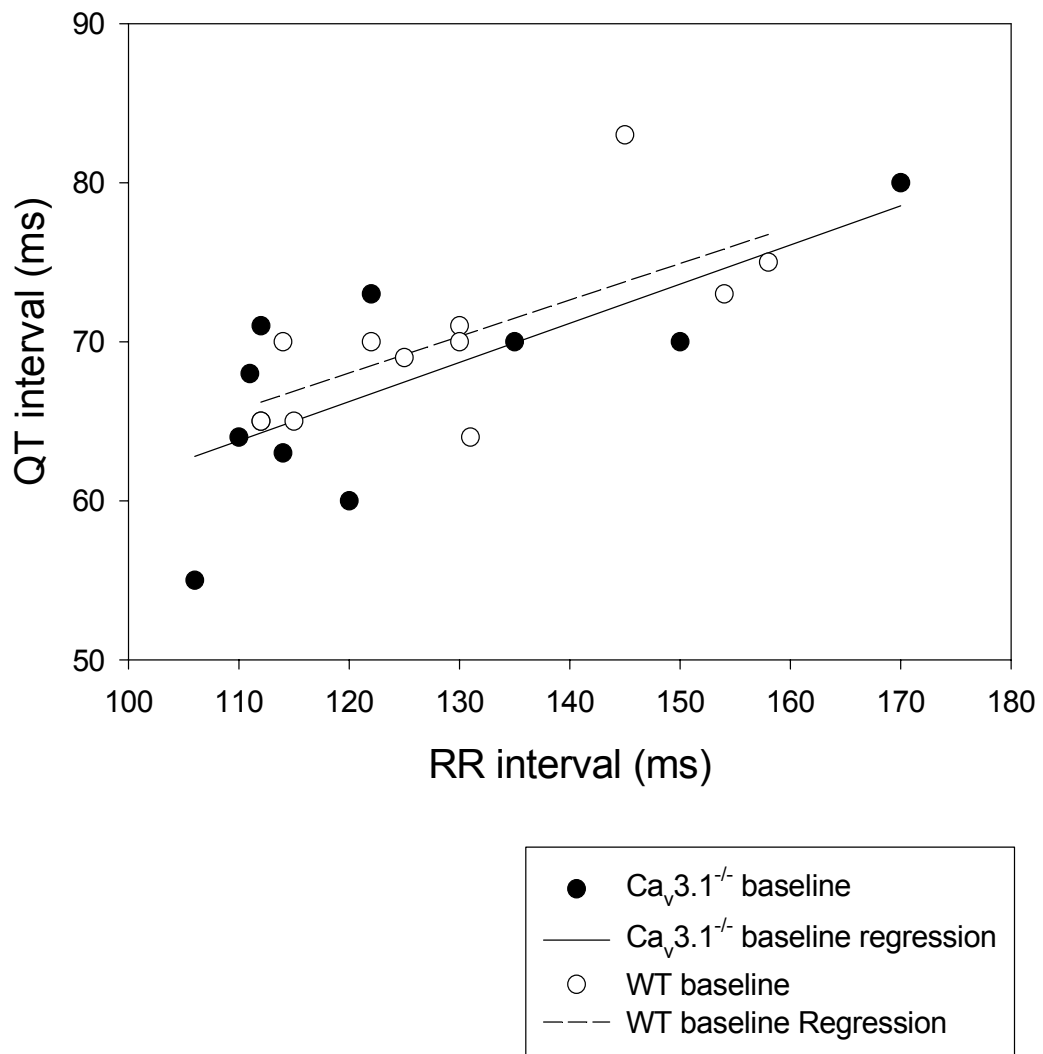


A



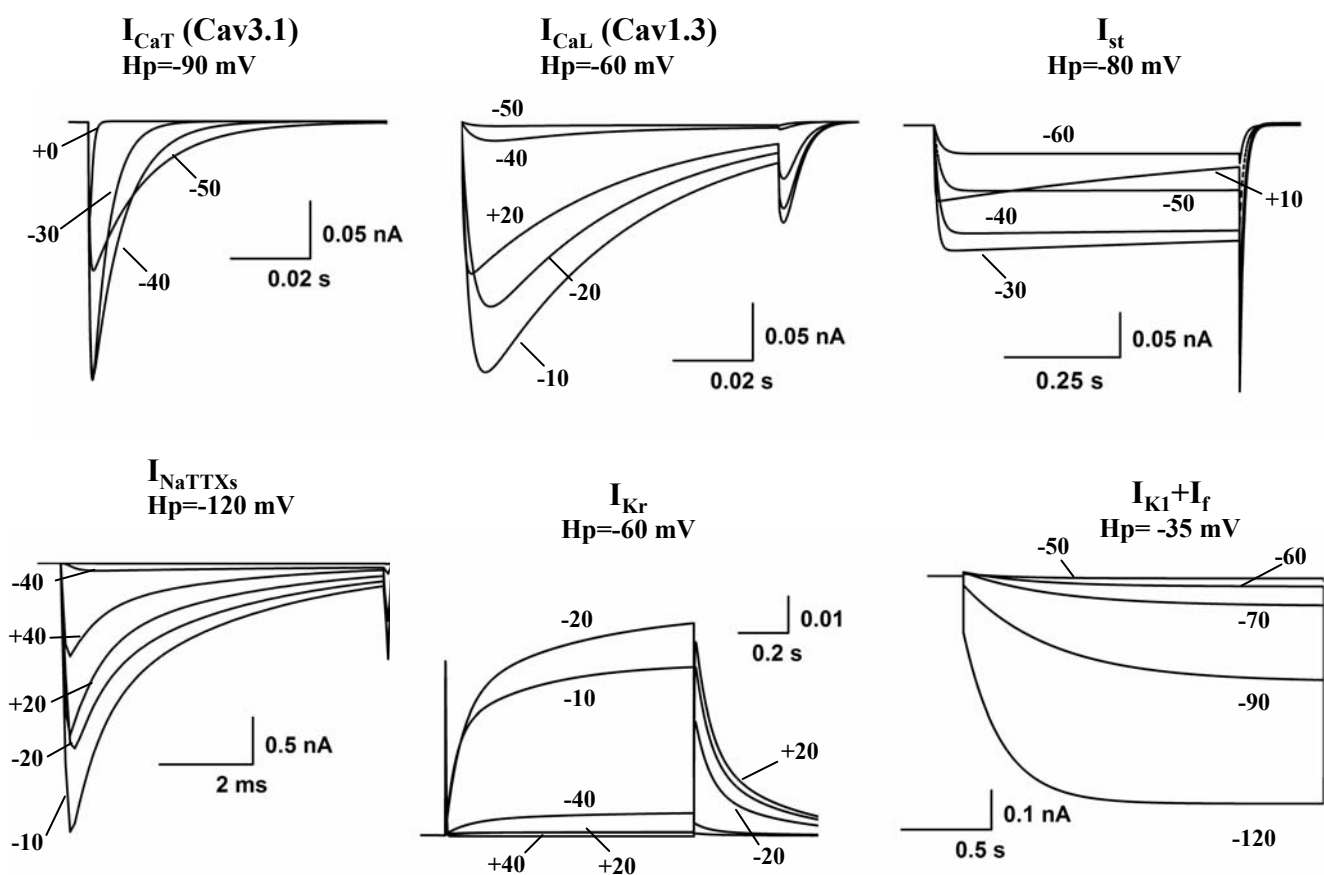
B



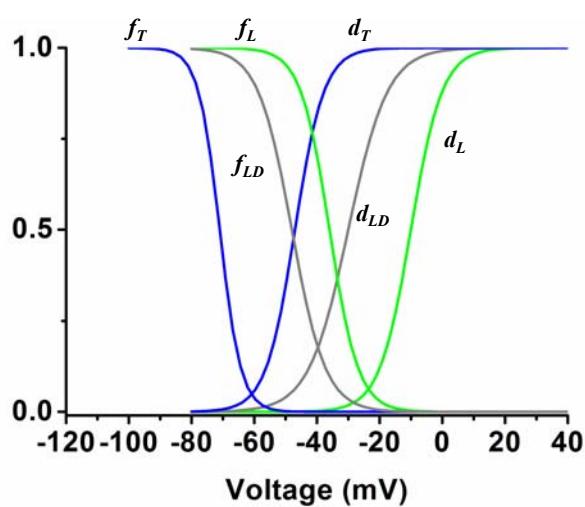


Mangoni et al. Supplementary Figure 3

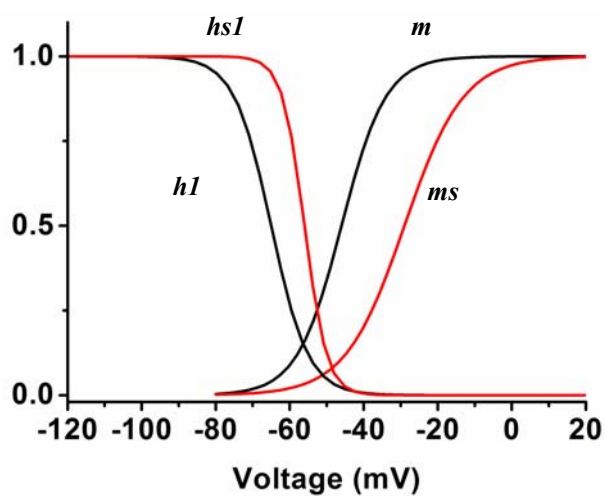
A

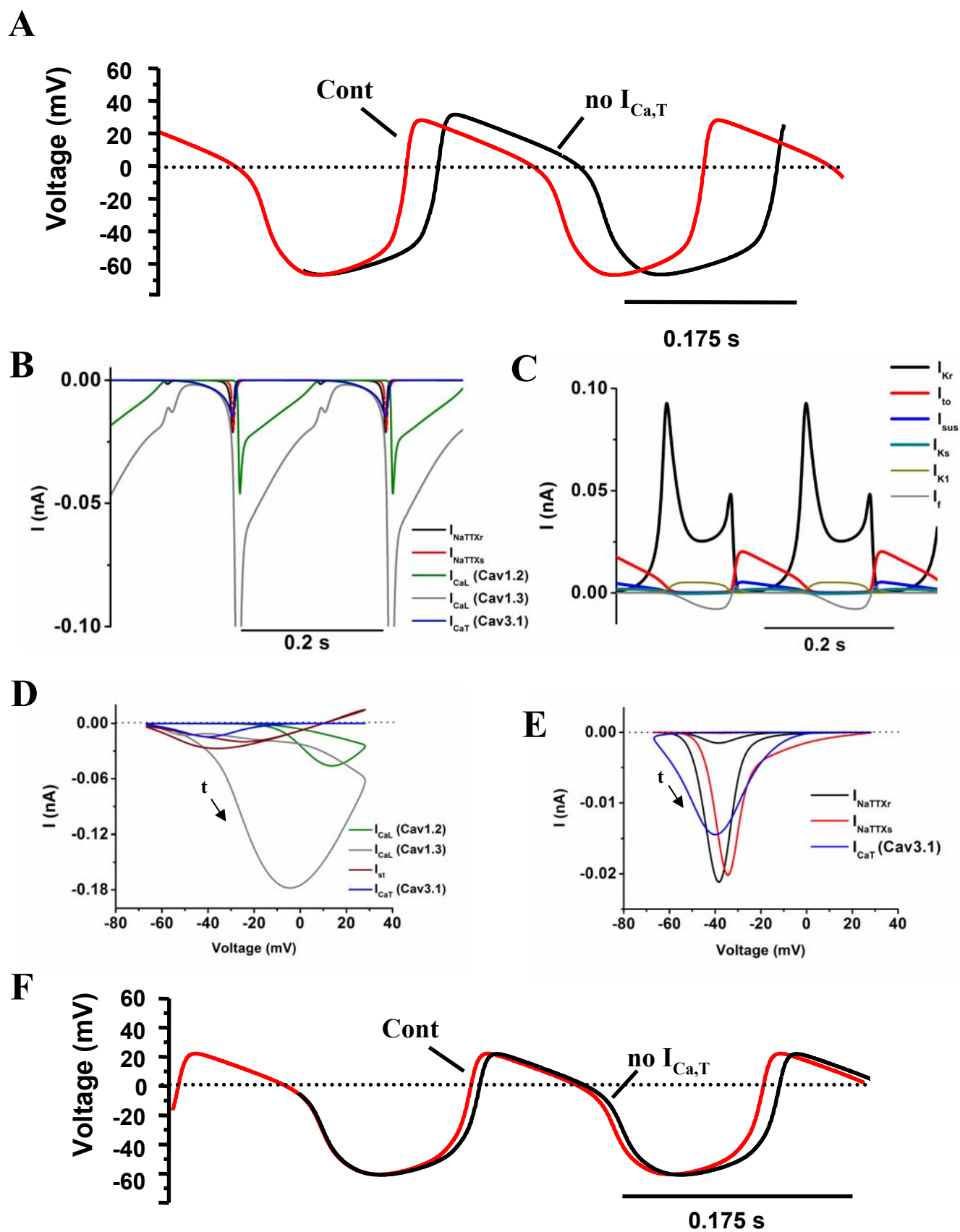


B



C





Mangoni et al. Supplementary Figure 5

B. Résultats

Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les cellules sinusales isolées de souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ et leurs contrôles (WT) ont révélé que le courant $I_{\text{Ca,T}}$ généré par la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ est une composante majeure des courants calciques dans ces cellules. Contrairement aux cellules sinusales des souris WT, celles des souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ ne présentent pas de courant $I_{\text{Ca,T}}$ détectable (Figure 1, article 1, page 100). L'invalidation des canaux $\text{Ca}_v3.1$ ne modifie toutefois pas le courant $I_{\text{Ca,L}}$.

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles *in vivo* de l'invalidation de la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$, nous avons enregistré sous anesthésie l'ECG chez des souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ et WT (Figure 3, article 1, page 100). En conditions de base, juste après anesthésie, seul un allongement de l'intervalle PQ a été mis en évidence chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ (37 ± 1 ms vs 34 ± 1 ms pour les souris WT, $p < 0.05$). Après blocage du système nerveux autonome, les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ conservaient leur allongement de la conduction AV, mais un ralentissement d'environ 10% de la fréquence cardiaque a également été mis en évidence. La durée de l'intervalle RR était de 144 ± 2 ms chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ contre 132 ± 2 ms chez les souris WT ($p < 0.05$). Les autres paramètres ECG n'étaient par ailleurs pas modifiés. En accord avec ce qui a été observé sous anesthésie, l'enregistrement de l'ECG chez des souris vigiles a confirmé la dysfonction sinusale et l'allongement de la conduction AV chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$. Les fréquences cardiaques moyennes mesurées sur 24h, sur 12h en période de jour (repos) et 12h en période de nuit (activité) étaient diminuées chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ par rapport aux souris WT (Figure 7 + tableau, article 1, page 100). Ces diminutions étaient d'environ 10% pour chacune des fréquences mesurées. Par contre, la fréquence cardiaque maximale mesurée sur 40 secondes n'était pas modifiée. Afin de vérifier toutefois que la balance sympathovagale n'était pas altérée chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$, nous avons réalisé une analyse spectrale de la variabilité de l'intervalle RR chez ces animaux et leurs contrôles. Aucune modification significative des composantes HF et LF n'a été mise en évidence. Comme la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ est exprimée dans les muscles lisses, nous nous sommes assurés que son invalidation n'avait pas de répercussions sur la pression artérielle systémique. Les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ avaient des valeurs de pression artérielle systolique, diastolique et moyenne similaires à celles mesurées chez les souris WT (Figure 7, article 1, page 100).

L'enregistrement de l'activité *pacemaker* de cellules sinusales isolées, chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$ et WT, a permis de confirmer que le ralentissement de la fréquence cardiaque observé *in vivo* était liée à une dysfonction de l'automatisme des cellules *pacemaker* (Figure 4, article 1, page 100). En effet, chez les souris $\text{Ca}_v3.1^{-/-}$, la fréquence de battement des cellules sinusales était diminuée de 37% par rapport à celle des cellules issues de souris WT

(163 ± 13 vs 234 ± 19 bpm pour les WT ; $p < 0.01$). Ce ralentissement de la fréquence était associé à une diminution de la pente de dépolarisation diastolique des cellules sinusales chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$. Les autres paramètres du potentiel d'action sinusal n'étaient pas modifiés.

Afin de situer le siège du bloc AV observé chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$, nous avons réalisé une exploration endocavitaire chez ces animaux. Un allongement de l'intervalle AH a été mis en évidence chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ (31 ± 1 ms) par rapport aux souris WT (25 ± 1 ms, $p < 0.001$). En l'absence d'allongement de la durée de l'onde P, la prolongation de l'intervalle AH signifie que le siège du bloc est nodal. L'exploration endocavitaire a par ailleurs montré un allongement du point de Wenckebach et de la période réfractaire du nœud AV chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ (Figure 5, article 1, page 100), deux arguments supplémentaires en faveur d'une dysfonction spécifique du nœud AV chez ces souris. Les périodes réfractaires auriculaires et ventriculaires n'étaient quant à elles pas modifiées. La stimulation atriale a confirmé la dysfonction sinusale existant chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$. Le temps de récupération sinusale corrigé était supérieur chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ (31 ± 5 ms) par rapport aux animaux WT (17 ± 2 ms, $p < 0.05$).

Le défaut de conduction nodale observé chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ est associé à l'absence de courant $I_{Ca,T}$ enregistrable dans les cellules isolées du nœud AV chez ces souris (Figure 6, article 1, page 100). Comme dans les cellules du nœud sinusal, le courant calcique $I_{Ca,L}$ n'était pas altéré par l'invalidation de la sous-unité $Ca_v3.1$ dans les cellules du nœud AV.

C. Discussion - Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que l'invalidation génétique de la sous-unité $Ca_v3.1$ des canaux calciques de type T entraîne un ralentissement de la fréquence cardiaque et un allongement de la conduction AV. Ce phénotype observé *in vivo* est associé à la disparition du courant $I_{Ca,T}$ dans les cellules du nœud sinusal et du nœud AV. La perte des canaux $Ca_v3.1$ dans les cellules sinusales provoque un ralentissement de l'activité *pacemaker* en augmentant la pente de dépolarisation diastolique. Cette étude constitue une démonstration de l'implication *in vivo* de la sous-unité $Ca_v3.1$ dans la genèse et la propagation de l'influx électrique dans le cœur.

Bien que la sous-unité $Ca_v3.2$ soit exprimée chez la souris (Marionneau *et al.*, 2005), elle ne semble participer que de façon minime au courant $I_{Ca,T}$ dans les cellules du nœud sinusal et du nœud AV, comme en atteste la disparition du courant $I_{Ca,T}$ dans ces cellules,

chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$. Ces résultats sont en accord avec l'absence de modification de la fréquence cardiaque et de la conduction AV chez les souris invalidées pour la sous-unité $Ca_v3.2$ (Chen *et al.*, 2003). L'absence de modification du courant $I_{Ca,L}$ démontre par ailleurs que les sous-unités $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ ne compensent pas l'invalidation de la sous-unité $Ca_v3.1$.

La réduction de la fréquence cardiaque observée chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ est modérée (10%) en comparaison de la forte diminution de la fréquence de battement des cellules sinusales isolées (37%). Cette différence peut être due à une compensation par les autres mécanismes participant à l'activité *pacemaker* et modulés par le tonus sympathique fort existant chez la souris. La fréquence cardiaque maximale non altérée chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ est en accord avec cette hypothèse qui laisse supposer que lors d'une stimulation adrénergique prononcée les autres mécanismes responsables de l'automatisme peuvent compenser la perte d' $I_{Ca,T}$. Ces mécanismes comprennent le courant $I_{Ca,L}$ médié par les canaux $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.2$, le courant I_f et le relargage de calcium du RS, par les récepteurs à la ryanodine (Zhang *et al.*, 2002 ; Mangoni *et al.*, 2003 ; Vinogradova *et al.*, 2002).

La comparaison de la réduction de fréquence cardiaque observée chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$ à celle décrite chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$ met en évidence que les courants $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ générés respectivement par chacune de ces sous-unités jouent des rôles différents *in vivo* dans le déclenchement de l'activité *pacemaker*. La fréquence cardiaque est fortement réduite chez les souris $Ca_v1.3^{-/-}$, de 20% en conditions de base et de 60% après blocage du système nerveux autonome (Zhang *et al.*, 2002), contre seulement 10% chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$, et ce à la fois chez l'animal vigile et l'animal anesthésié après blocage du système nerveux autonome. Les canaux $Ca_v3.1$ détermineraient donc la fréquence cardiaque basale mais interviendraient peu dans la modulation de l'automatisme par le système nerveux autonome.

Bien que la sous-unité $Ca_v3.1$ soit exprimée dans les fibres de Purkinje chez la souris (données non publiées du laboratoire), l'invalidation de cette sous-unité ne semble avoir aucun effet sur la durée de l'intervalle HV et du complexe QRS chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez les souris invalidées pour la sous-unité $Na_v1.5$ du canal sodique cardiaque. Les souris $Scn5a^{+/-}$ présentent en effet un allongement de la conduction AV avec en plus un allongement de la durée de l'onde P et du complexe QRS (Papadatos *et al.*, 2002). Chez les souris $Ca_v3.1^{-/-}$, le courant I_{Na} pourrait compenser la perte d' $I_{Ca,T}$ dans le système His-Purkinje et masquer les effets de l'invalidation de la sous-unité $Ca_v3.1$ sur la conduction infra-hissienne.

A ce jour, l'expression des canaux $Ca_v3.1$ dans le cœur est peu documentée chez l'homme. Dans les tissus auriculaires et ventriculaires, les transcrits des sous-unités $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ sont retrouvés, $Ca_v3.1$ étant plus fortement exprimée que $Ca_v3.2$. Ces sous-unités

sont plus fortement exprimées dans l'oreillette par rapport au ventricule. Aucune donnée n'existe dans le nœud sinusal, ou le nœud AV, mais dans les fibres de Purkinje, la sous-unité $Ca_v3.1$ est plus fortement exprimée que dans le ventricule (Données non publiées du laboratoire). Il est fort probable que le courant $I_{Ca,T}$ participe à l'activité *pacemaker* chez l'homme. En effet, plusieurs évidences vont dans ce sens. Tout d'abord, un inhibiteur des canaux calciques de type T, le mibefradil, ralentit la fréquence cardiaque, et cette molécule est connue pour ralentir l'activité *pacemaker* de préparations sinusales (Bernink *et al.*, 1996). Par ailleurs, dans les formes de bradycardie sinusale et de bloc congénital observés chez des nouveaux-nés dont les mères produisent des autoanticorps, une diminution du courant $I_{Ca,T}$ a récemment été mise en évidence, laissant supposer que, comme les canaux générant le courant $I_{Ca,L}$, les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ pourraient être la cible des autoanticorps (Hu *et al.*, 2004).

II. SOURIS $SCN5A^{+/-}$, UN MODÈLE D'ÉTUDE DES TROUBLES DU RYTHME CARDIAQUE ASSOCIÉS À UNE PERTE DE FONCTION DU GÈNE $SCN5A$

A. Dysfonction sinusale consécutive à l'invalidation du gène codant pour le canal sodique cardiaque, $Scn5a$, chez la souris.

1. Introduction

Le courant sodique I_{Na} a été enregistré dans les cellules du nœud sinusal chez la souris mais son rôle dans l'automatisme des cellules *pacemaker* demeure encore incertain (Mangoni & Nargeot, 2001 ; Cho *et al.*, 2003). Dans le nœud sinusal, deux types de canaux sodiques existent, des canaux TTX-résistants portés par la sous-unité $Na_v1.5$ (codé par le gène $Scn5a$) et des canaux TTX-sensibles portés par les sous-unités $Na_v1.1$ et $Na_v1.3$ (Maier *et al.*, 2003 ; Lei *et al.*, 2004). De manière intéressante, la sous-unité $Na_v1.5$ est absente de la zone centrale du nœud sinusal tandis que la sous-unité $Na_v1.1$ est retrouvée au centre et à la périphérie du nœud (Lei *et al.*, 2004). Ces différences d'expression régionale laissent supposer que les sous-unités $Na_v1.5$ et $Na_v1.1$ pourraient avoir une

contribution différente dans la genèse de l'automatisme et/ou dans sa propagation dans le nœud sinusal.

Des mutations perte de fonction du gène *SCN5A* ont été identifiées dans des formes familiales du syndrome de Brugada et de la maladie de Lenègre (Antzelevitch et al., 2003 ; Tan *et al.*, 2001). Plus récemment des mutations de ce gène ont aussi été identifiées dans des formes héréditaires de dysfonction sinusale, laissant supposer un rôle de la sous-unité $Na_v1.5$ dans l'automatisme cardiaque. Ces mutations réduisent la densité du courant I_{Na} (Benson *et al.*, 2003).

Par l'étude d'un modèle de souris invalidées pour le gène *Scn5a*, l'équipe de Ming Lei à Oxford, a exploré les rôles potentiels des canaux sodiques dans le nœud sinusal et les mécanismes par lesquels un défaut de ces canaux peut entraîner une dysfonction sinusale. A l'état homozygote, l'invalidation du gène *Scn5a* est létale chez la souris. A l'état hétérozygote, les animaux sont viables et présentent des anomalies de la conduction AV et intraventriculaire laissant supposer un défaut de fonctionnement des canaux sodiques cardiaques (Papadatos *et al.*, 2002). Cette étude à laquelle nous avons collaboré pour la partie *in vivo* a fait l'objet d'une publication dans la revue, Journal of Physiology (Lei *et al.*, 2005, article 2, page 106).

Article 2

Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene, *Scn5a*

Ming Lei¹, Catharine Goddard², Jie Liu¹, Anne-Laure Leoni³, Anne Royer³, Simon S.-M. Fung¹, Guosheng Xiao⁴, Aiqun Ma⁵, Henggui Zhang⁶, Flavien Charpentier³, Jamie I. Vandenberg⁷, William H. Colledge², Andrew A. Grace² & Christopher L.-H. Huang²

¹ University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford, UK.

² Cardiovascular Group, Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Cambridge, UK.

³ Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France.

⁴ Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, The People's Republic of China.

⁵ First Hospital, Xi'an Medical School, Xi'an Jiaotong University, The People's Republic of China.

⁶ Biological Physics Group, Physics Department, UMIST, Manchester, UK.

⁷ Electrophysiology and Biophysics Program, Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, Australia.

THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*

Ming Lei, Catharine Goddard, Jie Liu, Anne-Laure Léoni, Anne Royer, Simon S.-M. Fung, Guosheng Xiao, Aiqun Ma, Henggui Zhang, Flavien Charpentier, Jamie I. Vandenberg, William H. Colledge, Andrew A. Grace and Christopher L.-H. Huang

J. Physiol. 2005;567;387-400; originally published online Jun 2, 2005;

DOI: 10.1113/jphysiol.2005.083188

This information is current as of July 18, 2006

This is the final published version of this article; it is available at:
<http://jp.physoc.org/cgi/content/full/567/2/387>

This version of the article may not be posted on a public website for 12 months after publication unless article is open access.

The Journal of Physiology Online is the official journal of The Physiological Society. It has been published continuously since 1878. To subscribe to *The Journal of Physiology Online* go to: <http://jp.physoc.org/subscriptions/>. *The Journal of Physiology Online* articles are free 12 months after publication. No part of this article may be reproduced without the permission of Blackwell Publishing: JournalsRights@oxon.blackwellpublishing.com

Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*

Ming Lei¹, Catharine Goddard², Jie Liu¹, Anne-Laure Léoni³, Anne Royer³, Simon S.-M. Fung¹, Guosheng Xiao⁴, Aiqun Ma⁵, Henggui Zhang⁶, Flavien Charpentier³, Jamie I. Vandenberg⁷, William H. Colledge², Andrew A. Grace² and Christopher L.-H. Huang²

¹University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford, OX1 3PT UK

²Cardiovascular Group, Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW UK

³INSERM U533, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cellulaires et Moléculaires, Faculté de Médecine, Nantes, France

⁴Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, The People's Republic of China

⁵First Hospital, Xi'an Medical School, Xi'an Jiaotong University, The People's Republic of China

⁶Biological Physics Group, Physics Department, UMIST, Manchester, M60 1QD UK

⁷Electrophysiology and Biophysics Program, Victor Chang Cardiac Research Institute, 384 Victoria Street, Darlinghurst, NSW2010, Australia

We have examined sino-atrial node (SAN) function in hearts from adult mice with heterozygous targeted disruption of the *Scn5a* gene to clarify the role of *Scn5a*-encoded cardiac Na⁺ channels in normal SAN function and the mechanism(s) by which reduced Na⁺ channel function might cause sinus node dysfunction. *Scn5a*^{+/-} mice showed depressed heart rates and occasional sino-atrial (SA) block. Their isolated peripheral SAN pacemaker cells showed a reduced Na⁺ channel expression and slowed intrinsic pacemaker rates. Wild-type (WT) and *Scn5a*^{+/-} SAN preparations exhibited similar activation patterns but with significantly slower SA conduction and frequent sino-atrial conduction block in *Scn5a*^{+/-} SAN preparations. Furthermore, isolated WT and *Scn5a*^{+/-} SAN cells demonstrated differing correlations between cycle length, maximum upstroke velocity and action potential amplitude, and cell size. Small myocytes showed similar, but large myocytes reduced pacemaker rates, implicating the larger peripheral SAN cells in the reduced pacemaker rate that was observed in *Scn5a*^{+/-} myocytes. These findings were successfully reproduced in a model that implicated *i*_{Na} directly in action potential propagation through the SAN and from SAN to atria, and in modifying heart rate through a coupling of SAN and atrial cells. Functional alterations in the SAN following heterozygous-targeted disruption of *Scn5a* thus closely resemble those observed in clinical sinus node dysfunction. The findings accordingly provide a basis for understanding of the role of cardiac-type Na⁺ channels in normal SAN function and the pathophysiology of sinus node dysfunction and suggest new potential targets for its clinical management.

(Resubmitted 16 January 2005; accepted after revision 31 May 2005; first published online 2 June 2005)

Corresponding authors M. Lei: University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford, OX1 3PT UK. Email: ming.lei@physiol.ox.ac.uk or C. L.-H. Huang: Physiological Laboratory, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EG, UK. Email: clh11@cam.ac.uk

The sino-atrial node (SAN) initiates normal rhythmic cardiac excitation. SAN automaticity in turn requires a spontaneous diastolic depolarization within its contained pacemaker cells that is the result of complex reciprocal interactions between decays in outward delayed rectifier K⁺ currents (*i*_K) on the one hand and activation of inward Na⁺-dependent background (*i*_{b,Na}), hyperpolarization-activated inward (*i*_f), T-type (*i*_{Ca,T}) and L-type Ca²⁺ (*i*_{Ca,L}) and sustained inward currents (*i*_{st}) on the other (Irisawa *et al.* 1993; Boyett *et al.* 2000; Mitsuiye *et al.* 2000). Na⁺–K⁺ pump (*i*_{NaK}) and Na⁺–Ca²⁺

exchanger currents (*i*_{NaCa}) and intracellular Ca²⁺ handling also contribute (Irisawa *et al.* 1993; Boyett *et al.* 2000; Bogdanov *et al.* 2001). Inward voltage-dependent Na⁺ current, *i*_{Na}, has been recorded from SAN cells (Nathan, 1986; Irisawa *et al.* 1993; Honjo *et al.* 1996; Mangoni & Nargeot, 2001; Cho *et al.* 2003). However possible contributions from voltage-dependent Na⁺ currents, *i*_{Na}, to SAN pacemaker function remain uncertain: *i*_{Na} occurs only in some pacemaker cells and in any case may inactivate at relatively positive potentials (Nathan, 1986; Irisawa *et al.* 1993; Honjo *et al.* 1996).

There has nevertheless been significant recent progress in our molecular understanding of voltage-gated Na^+ channels. These contain both pore-forming α -(Na_v) and auxiliary β -subunits (Catterall, 2000; Goldin, 2001). Thus far, 10 α -subunits, with tissue-specific distributions and distinct pharmacological properties, and four β -subunits have been identified (Goldin, 2001; Yu & Catterall, 2003). The tetrodotoxin (TTX)-resistant $\text{Na}_v1.5$ isoform accounts for most of the cardiac Na^+ channels in the heart; however, recent work has also demonstrated TTX-sensitive neuronal ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.6$) isoforms (Malhotra *et al.* 2001; Maier *et al.* 2002, 2003). The SAN expresses both TTX-sensitive neuronal Na^+ channels, whose block slows heart rate (Maier *et al.* 2003), and TTX-resistant cardiac Na^+ channels (Lei *et al.* 2004). However, these channels may be differentially expressed in different SAN regions compatible with their having contrasting contributions to rhythm generation and/or propagation (Lei *et al.* 2004).

Loss-of-function mutations in the *SCN5A* encoding cardiac $\text{Na}_v1.5$ Na^+ channels were initially described in patients with the Brugada and Lev-Lenègre syndromes (Tan *et al.* 2001; Antzelevitch *et al.* 2003) but have now been reported in kindreds with familial sinus node dysfunction (SND) (Benson *et al.* 2003). Specific mechanisms underlying the observed sinus bradycardia, sinus arrest and/or sino-atrial block with which they are associated, whether involving abnormal automaticity, exit block, or impaired intra-atrial conduction and excitability, remain uncertain. Nevertheless, some patients with *SCN5A* mutations associated with long QT syndrome type 3 (LQT3) also show evidence of SND (Veldkamp *et al.* 2003) compatible with roles for cardiac-type Na^+ channels in normal SAN function. Furthermore, heterologous expression of recombinant Na^+ channels predicted from clinical studies in non-excitable cells suggest that Na^+ conductance is reduced by *SCN5A* mutations causing SND (Benson *et al.* 2003).

The work described in this paper explores possible roles for Na^+ channels in the normal function of the SAN and mechanisms by which Na^+ channel defects might cause SND in pacemaker myocytes using a genetic model system. We have recently established mice with a null mutation in *Scn5a* whose homozygous disruption causes intrauterine lethality; heterozygotes (*Scn5a*^{+/-}) are viable but show defects suggesting altered Na^+ channel function including impaired atrioventricular conduction, delayed intramyocardial conduction, and ventricular tachycardia with characteristics of re-entrant excitation (Papadatos *et al.* 2002).

Methods

Scn5a-deficient and normal (WT) mice

Mice with targeted disruption of *Scn5a* were generated as previously described (Papadatos *et al.* 2002). The

experiments used adult mice aged between 2.5 and 5 months for long-term ECG recordings and 3–10 months for single cell and intact SA node studies. Mice were inbred onto a 129/Sv genetic background. Comparisons were made unless otherwise stated between equal numbers of male and female *Scn5a*^{+/-} mutants and WT littermates. All animal procedures conformed with the United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act 1986.

Electrocardiographic (ECG) recordings

Numerical recordings of lead I–III surface ECGs (EMKA technologies, Paris, France) used 25-gauge subcutaneous electrodes and ECG channels bandpass-filtered between 0.5 and 250 Hz in adult anaesthetized (15 mg kg⁻¹ intraperitoneal etomidate) mice. The long-term ECG recordings introduced subcutaneous telemetric transmitters (TA10EA-F20, Data Sciences International, St Paul, MN, USA), with paired wire bipolar electrodes placed over the thorax, into a posterior incision made under anaesthesia (intraperitoneal etomidate, 8 mg kg⁻¹; thiopental, 40 mg kg⁻¹). Experiments began at least 4 days after surgical recovery with mice housed in individual cages in thermostatically controlled rooms subject to 12 h light–dark cycles (light: 7:00 am to 7:00 pm) with free access to food and water. ECG signals were recorded telemetrically following analog-to-digital conversion (Data Sciences International).

Electrophysiological recordings from single cells

Individual SAN cells isolated from hearts of adult mice (either sex) (Lei *et al.* 2004) were initially perfused with normal Tyrode solution (mM: 140 NaCl; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 glucose; 5 Hepes; pH 7.4 with NaOH) as described earlier (Lei *et al.* 2004). The SAN cells were identified by their morphology and spontaneous activity. The studies of i_{Na} reduced NaCl to 67 mM (NaCl replaced by CsCl) and added 300 nM extracellular nifedipine to block $i_{\text{Ca,L}}$. The patch pipette solutions contained (mM): 10 NaCl; 140 KCl; 2 EGTA; 1 MgCl₂; 5 MgATP; 10 Hepes (pH 7.3 with KOH for voltage clamping experiments) and 140 KCl; 1.8 MgSO₄; 5 Hepes; 0.1 EGTA; titrated to pH 7.3 with KOH with amphotericin (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) added before the beginning of the current clamping experiments.

Cells were superfused at 37°C at 2 ml min⁻¹. Current and voltage clamping used an Axopatch-200B patch clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA); whole cell recording was performed as previously described (Lei *et al.* 2004). Residual uncompensated series resistance prior to compensation was < 5 M Ω . Capacitive current transients were electronically subtracted with series resistance compensation typically at 80%. Current signals were filtered at 10 kHz and

sampled at 20 kHz. All current traces were leak-subtracted offline following acquisition and analysis using pCLAMP8 software (Axon Instruments). Cell capacitance (C_m) was obtained from the capacity compensation control of the amplifier following correlation of the whole cell capacity current in response to 5 ms pulses to -70 mV from a holding potential of -60 mV repeated at a frequency of 100 Hz. A previous study has checked the accuracy of this method by integrating the area of the uncompensated capacity current and fitting an exponential function to the decay of the uncompensated capacity current (Honjo *et al.* 1996). We did not observe significant rundown in either groups of cells over the ~ 20 min duration of our experiments, which were carried out under identical conditions in both groups: in the course of our procedures, the magnitudes of the peak currents at the beginning and end of the protocols were routinely checked.

Current–voltage relationships obtained from cells subject to activating steps also yielded normalized activation curves for the peak Na^+ conductance, g_{Na} . The corresponding i_{Na} inactivation curves were obtained using standard double pulse protocols repeated at 1 s intervals between series in which conditioning pulses of duration 100 ms were made to potentials between -120 and -20 mV from a -120 mV holding potential; these were then followed by test pulses of 10 ms duration to a fixed membrane potential of -30 mV. Fitting of both the activation and inactivation curves to both the sum of two as well as a single Boltzmann function was attempted using a Levenberg-Marquadt procedure (Press *et al.* 1986) that performed successive least squares minimizations for the values of each of the parameters of a generalized non-linear function simultaneously over all the experimentally obtained mean values obtained at each test voltage. Successive iterations sought to minimize the values of χ^2 in the weighted fit using the means and standard errors of the data points. The number of degrees of freedom incorporated not only the number of data points but also the number of variables. The curve fits used a weighting factor for each point that was determined by the inverse of its variance in turn normalized to the average of all such weighting factors. This precaution yielded the maximum likelihood that the fitted function would represent the distribution of the parent data. However, whereas the fits to a single Boltzmann function converged to give half-activation voltages, $V_{1/2}$, steepness factors, k , and maximum values, those using the sum of two rather than one Boltzmann function did not converge.

Electrical mapping of intact SAN

Intact SAN preparations dissected as previously described (Lei *et al.* 2001, 2002) were superfused with Tyrode solution at 37°C at a rate of $5\text{--}6\text{ ml min}^{-1}$ via a heat

exchanger. Intracellular action potentials were recorded using conventional microelectrodes (resistance $\sim 30\text{ M}\Omega$); activation times were mapped from extracellular potentials recorded using modified bipolar electrodes placed on 90–100 sites using a calibrated x,y,z -micromanipulator with 0.1 mm precision (Yamamoto *et al.* 1998). This adopted the output from similar, reference, bipolar electrodes placed on the atrial muscle near the crista terminalis as reference signal. Electrical signals were digitized at 5 kHz by a DigiData 1322A analog to digital converter (Axon Instruments Inc.) and stored on a computer for later analysis. Activation times were given by the time interval separating the initial negative deflections of electrograms from the exploring and reference electrodes with the site showing the earliest activation taken to be the leading pacemaker site. Such electrodes were also used to map the dimensions of the preparation at the outset of each experiment by recording the coordinates of various anatomical landmarks. This permitted a coordinate mapping for the excitation spread from the leading pacemaker site using SigmaPlot 9.0 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA), drawing isochrones at 5 ms intervals.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on tissue sections from adult mice (either sex) as described earlier (Lei *et al.* 2004). Sections were incubated with rabbit polyclonal anti- $\text{Na}_v1.5$ and anti- $\text{Na}_v1.1$ (diluted 1:100; Alomone Laboratories, Israel). For control sections, primary antibodies were pre-incubated with their antigenic peptides, or no primary antibody was used. Image J (NIH) was used for relative fluorescence intensity quantitative analysis. Immunolabelled sections, mounted in Citifluor mounting medium (Agar Scientific, UK), were examined on a Leica DMIRM fluorescence microscope and a TCS-SP2 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Germany) using 488 nm excitation and 500–535 nm emission for Alexa488 labelling. Single optical slices were recorded under consistent pinhole, laser intensity and detector settings (Pawley, 1990).

Computer simulations

The possibility that i_{Na} could participate in both the initiation and conduction of pacemaker activity was assessed in computer simulations that were based upon a gradient model of the intact SAN and atrium. This was developed from single cell models of electrical activity of rabbit SAN (Zhang *et al.* 2000) and atrial cells (Oxsoft HEART, version 4.8. Oxsoft Ltd, Oxford) and used the one-dimensional partial differential equation previously described (Zhang *et al.* 2000). Though developed for the rabbit heart, the model shares common features with the

mouse SAN, in particular the gradient of i_{Na} distribution across the tissue. The modelling assumed a SAN centre of radius 1.5 mm that contained a uniform density of TTX-sensitive neuronal Na^+ channels, and began by assuming that these would give a maximum current of 10 pA pF^{-1} . The surrounding SAN periphery was assumed to have an annular radius of 1.5 mm and to contain both neuronal and cardiac Na^+ channels at a density that increased towards the periphery giving maximum currents from 10 pA pF^{-1} to the 60 pA pF^{-1} towards the periphery as reported below. The remaining ionic current densities were as described experimentally for the rabbit SAN (Honjo *et al.* 1996, 1999; Lei *et al.* 2000, 2001). The numerical simulations then investigated the effect of progressively reducing i_{Na} density selectively both in the SAN centre and in the SAN periphery adjacent to the atrium. The pacemaker cycle length (CL) was measured as the time interval between two successive APs. The sino-atrial conduction time (SACT) was measured as the time taken for the excitation wave fronts to travel between two recording sites s1, within the SAN 2 mm from the SAN-atrial border and s2, within the atrium, 9 mm from the SAN-atrial border.

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. (number of animals or preparations or cells). Differences were evaluated by Student's unpaired *t* test with a *P* value < 0.05 considered significant.

Results

The mouse SA nodes, located in the intercaval region parallel to the crista terminalis (CT) (Verheijck *et al.* 2001; Liu *et al.* 2004), resembled those previously reported in rabbit and other small mammals (Bleeker *et al.* 1980; Opthof *et al.* 1987; Boyett *et al.* 2000). Thus they showed a greater nuclear density and lighter cytoplasm than the surrounding atrial tissue reflecting the smaller size of SA node cells. Such cells nevertheless increased in size from the centre to the periphery. It was thus possible to identify the ($\sim 300 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$) primary pacemaker area thought typically to contain ~ 450 primary pacemaker cells. The central cells interweave in a circular pattern around the sinus artery and are orientated perpendicular to the CT; cells in the SAN periphery and atrial muscle of the CT are mainly orientated parallel to the CT. The nodal tissue is separated from atrial myocardium at its atrial free wall and septal sides by connective tissue (Liu *et al.* 2004).

Expression of Na^+ channels in $\text{Scn5a}^{+/-}$ SAN cells

Figure 1A–C compare typical tissue sections (A and B), and relative fluorescence intensity plots (C) through the thick CT and thin intercaval region, which contains the SAN, from male WT ($n = 5$ for $\text{Na}_v1.5$, $n = 4$ for $\text{Na}_v1.1$) and male $\text{Scn5a}^{+/-}$ ($n = 5$ for $\text{Na}_v1.5$, $n = 4$

for $\text{Na}_v1.1$) hearts labelled using a specific antibody against $\text{Na}_v1.5$ or $\text{Na}_v1.1$ channels. Immunofluorescence signal from both SAN and surrounding regions from WT and $\text{Scn5a}^{+/-}$ SAN tissue sections were compared under identical imaging conditions (Methods) at low and high magnifications using fluorescence confocal microscopy. There was much lower labelling in $\text{Scn5a}^{+/-}$ cells consistent with a reduced expression of $\text{Na}_v1.5$ following heterozygous disruption of *Scn5a* (Fig. 1A) exemplified by the results of the semi-quantitative analysis illustrated in Fig. 1C. $\text{Scn5a}^{+/-}$ tissue demonstrated considerably lower overall $\text{Nav}1.5$ fluorescence signal in both atrial ($63 \pm 4\%$ that of WT) and SAN ($75 \pm 9\%$ that of WT) compared with corresponding regions in WT hearts. Furthermore, the $\text{Na}_v1.5$ channel was selectively expressed in peripheral SAN and the surrounding atrial muscle: cells in the centre of the SAN surrounding the SAN artery showed little labelling in either case.

In contrast, $\text{Na}_v1.1$ signal was detected throughout the tissue including the centre and the periphery of the SAN with the SAN and surrounding atrial muscle showing similar expression patterns in the WT and $\text{Scn5a}^{+/-}$ hearts (Fig. 1B). It was not possible fully to quantify fluorescence intensity of $\text{Nav}1.1$ in the SAN regions in the WT and $\text{Scn5a}^{+/-}$ hearts owing to the presence of non-specific nuclear staining that has been previously reported with use of some Na^+ channel antibodies (see Kucera *et al.* 2002). No labelling above background was obtained when the primary antibodies (anti- $\text{Na}_v1.5$ or anti- $\text{Na}_v1.1$) or secondary antibody were omitted or were pre-incubated with their antigenic peptides (data not shown). SAN cells nevertheless increased in size from centre to the periphery.

Na^+ channel properties in $\text{Scn5a}^{+/-}$ SAN cells

Isolated SAN cells from two male WT and two male $\text{Scn5a}^{+/-}$ mice were identified through their spindle-shaped morphology (Fig. 2A), spontaneous activity and the presence of Na^+ currents (i_{Na}) in response to patch clamp voltage steps of 20 ms duration from a -120 mV holding potential to test potentials between -90 and $+30 \text{ mV}$. Both WT and $\text{Scn5a}^{+/-}$ SAN cells displayed inward Na^+ currents with typical activating and inactivating kinetics (Fig. 2B and C). The corresponding current–voltage relationships derived from the maximum i_{Na} (Fig. 2D) demonstrated similar thresholds for i_{Na} activation close to a -70 mV test potential and maximum peak currents at similar voltages ($\sim -20 \text{ mV}$) at 37°C . However, $\text{Scn5a}^{+/-}$ cells showed significantly reduced peak current densities (Fig. 2D and Table 1) ($36 \pm 1 \text{ pA pF}^{-1}$, $n = 6$, $C_m = 38\text{--}55 \text{ pF}$, $47 \pm 2.4 \text{ pF}$) compared with WT myocytes ($57 \pm 4 \text{ pA pF}^{-1}$, $n = 6$, $C_m = 36\text{--}58 \text{ pF}$, $48 \pm 3.0 \text{ pF}$, $P < 0.01$). Moreover, there was a significant

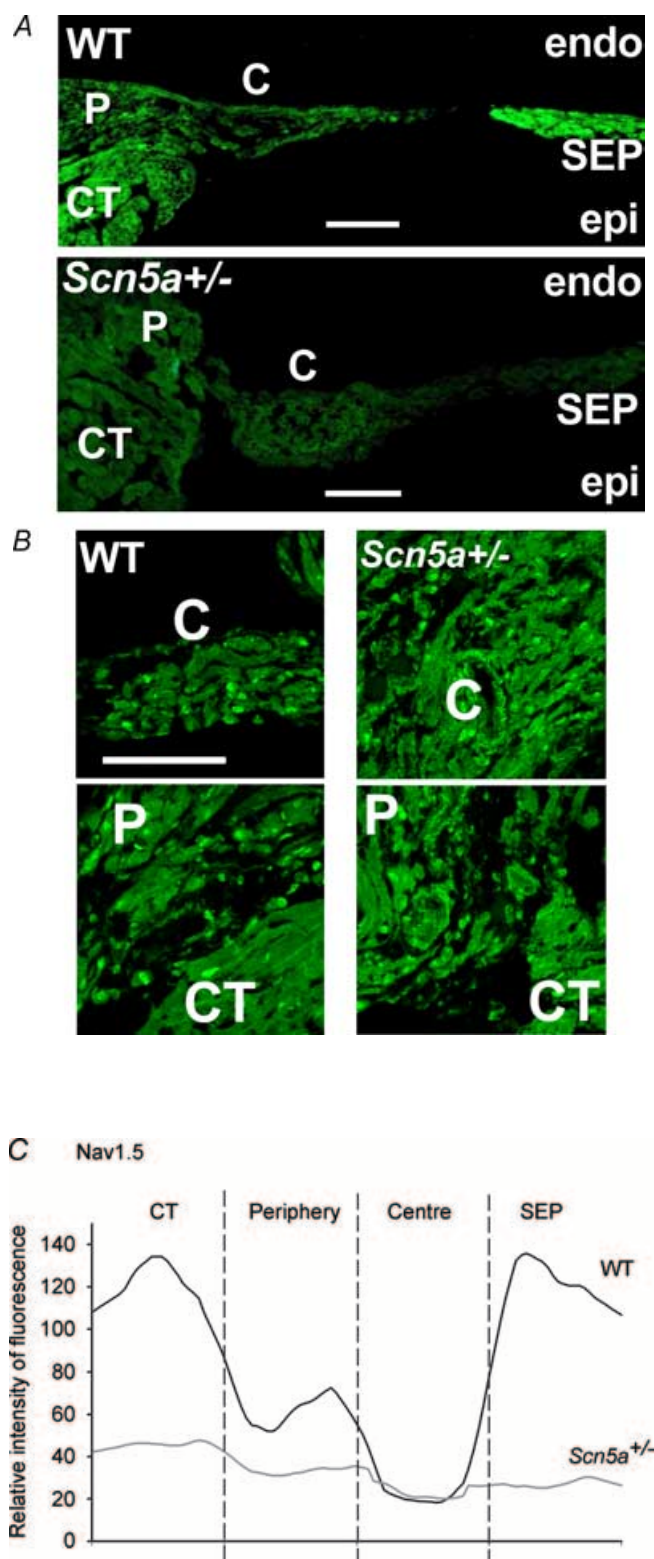


Figure 1. Expression of Na_v1.1 and Na_v1.5 Na⁺ channels in WT and Scn5a^{+/-} SANs

A, labelling of Na_v1.5 in WT (top) and Scn5a^{+/-} (bottom) SANs. **B**, labelling of Na_v1.1 in WT (left) and Scn5a^{+/-} (right) SANs. **C**, regional comparison of relative fluorescence intensity in and around

correlation between the density of i_{Na} and cell membrane capacitances in WT cells ($n = 6$, $r^2 = 0.71$, $P < 0.05$) but not in Scn5a^{+/-} cells ($n = 6$, $r^2 = 0.21$, $P > 0.05$).

The current–voltage relationships also yielded normalized activation curves (Fig. 2E) for the peak Na⁺ conductance, g_{Na} . Fitting of the activation (Fig. 2E) and inactivation curves (Fig. 2F) to a Boltzmann equation (Table 1) gave respective values of half-activation voltage, $V_{1/2}$, and steepness factor, k , in Scn5a^{+/-} myocytes that were statistically indistinguishable from the corresponding values for the WT. These findings suggest that SAN cells from Scn5a^{+/-} mice have reduced Na⁺ channel densities but similar Na⁺ channel gating characteristics.

Heart rate and SAN function in Scn5a^{+/-} mice

We next studied heart rates and rhythm in ambulant mice (5 male WT, 6 male Scn5a^{+/-}) and electrical activity in isolated SAN preparations (from 4 male and 4 female WT, 4 male and 3 female Scn5a^{+/-} mice) to assess the physiological effects of reduced Na⁺ channel conductance on SAN pacemaker function. Telemetered, long-term ECG recordings showed that Scn5a^{+/-} (546 ± 24 beats min⁻¹, $n = 6$) had significantly lower mean heart rates, as recorded over 60 h, compared with WT mice (592 ± 17 beats min⁻¹, $n = 5$; $P < 0.01$). Standard ECG studies under anaesthesia showed the occasional Scn5a^{+/-} mouse (2 out of 67 studied) but none of the WT mice (out of 57) showed a persistent sino-atrial (SA) block, which might reflect an extreme manifestation of the sinus node anomalies shown in the Scn5a^{+/-} mice. Figure 3B exemplifies recordings from a (24 week old) Scn5a^{+/-} mouse with completely absent P waves showing a junctional escape rhythm, and Fig. 3C illustrates a trace, recorded at 60 weeks, in which P waves were present only before a minority of the ECG waveforms. These findings might reflect either SA block or sinus arrest. Both these findings contrast with the normal ECG patterns that were shown by the WT (Fig. 3A).

Secondly, pacemaker activity and activation patterns were determined from extracellular potential (ECP) recordings that were made from ~200 recording sites at a resolution of 0.2–0.3 mm over the SAN and surrounding atrial muscle (Fig. 4A). Spontaneous pacemaker activity began in the SAN centre (the leading pacemaker site).

the SAN in Na_v1.5 in WT and Scn5a^{+/-} SANs. C, centre of the SAN; P, periphery of the SAN; endo, endocardium; epi, epicardium; CT, crista terminalis; SEP, atrial septum. Relative fluorescence intensity was calculated by Image J 1.29x (NIH, USA). Measurements of grey scale pixel intensity are based on the selected area of interests. The pixel intensity is plotted against a fixed distance within the region of interest along the line from CT, peripheral SA node, centre SAN and septum. Scale bar, 100 μm.

It then propagated to the crista terminalis and interatrial septum. The *Scn5a*^{+/-} ($n = 8$) and WT ($n = 7$) SAN preparations showed similar overall patterns of activation. However, the *Scn5a*^{+/-} preparations showed a significantly slower conduction towards the SAN periphery and around the SAN–atrial junction indicating a peripheral exit block reflecting slowed conduction (Fig. 4*B* and *C*).

Thirdly, intact SAN preparations from WT mice showed regular spontaneous activity with a 170 ± 7 ms ($n = 7$) cycle length (CL). The *Scn5a*^{+/-} SAN showed longer CLs (223 ± 14 ms, $n = 8$, $P < 0.05$ compared with WT SAN) indicating lower pacemaker rates (Fig. 4*D* and *E*). Sino-atrial conduction times (SACTs) obtained from simultaneous ECP recordings (Fig. 4*F* and *G*) from the SAN centre (site a: Fig. 4*B* and *C*) and neighbouring atrial muscle (site c: Fig. 4*B* and *C*) were significantly longer in *Scn5a*^{+/-} (16 ± 2 ms, $n = 8$) compared with WT (12 ± 1 ms, $n = 7$, $P < 0.05$). Additionally, 3 out of 8 *Scn5a*^{+/-} SANs but none of the WT preparations also showed evidence of a 3 : 2 or 2 : 1 SA conduction block (Fig. 4*H*).

Finally, those features of spontaneous pacemaker activity that related to cell size, type and current densities

(Honjo *et al.* 1996; Lei *et al.* 2001) were compared in isolated SAN cells (from 3 male and 1 female WT, 3 male and 1 female *Scn5a*^{+/-} mouse, respectively). Intracellular recordings from small cells, previously defined as having cell membrane capacitances $C_m \leq 30$ pF in rabbit SAN cells, presumably from the SAN centre (Honjo *et al.* 1996, 1999; Lei & Boyett, 1998; Lei *et al.* 2001; Musa *et al.* 2002) (Fig. 5*A* and *B*), demonstrated similar pacemaker rates in *Scn5a*^{+/-} (CL = 164 ± 3 ms; C_m , 30 ± 1 pF, $n = 3$) compared with WT myocytes (CL = 177 ± 2 ms; C_m , 30 ± 3 pF, $n = 2$). In contrast, larger cells, defined as having $C_m > 35$ pF, presumably from the SAN periphery (Honjo *et al.* 1996, 1999; Lei & Boyett, 1998; Lei *et al.* 2001; Musa *et al.* 2002) (Fig. 5*C* and *D*), demonstrated generally slower pacemaker rates and lower AP peaks in *Scn5a*^{+/-} (CL = 186 ± 7 ms; C_m , 45 ± 4 pF, $n = 4$) than in WT myocytes (CL = 161 ± 3 ms; C_m , 46 ± 4 pF, $n = 5$). However, the average firing rate of SAN cells was not significantly different ($P > 0.05$, WT *versus* *Scn5a*^{+/-}, unpaired *t* test) between WT (CL = 166 ± 4 ms, $n = 7$) and *Scn5a*^{+/-} (CL = 177 ± 6 ms, $n = 7$). Figure 5*E–I* plots a range of cellular characteristics that bear on spontaneous pacemaker activity against cell size as reflected in C_m . It

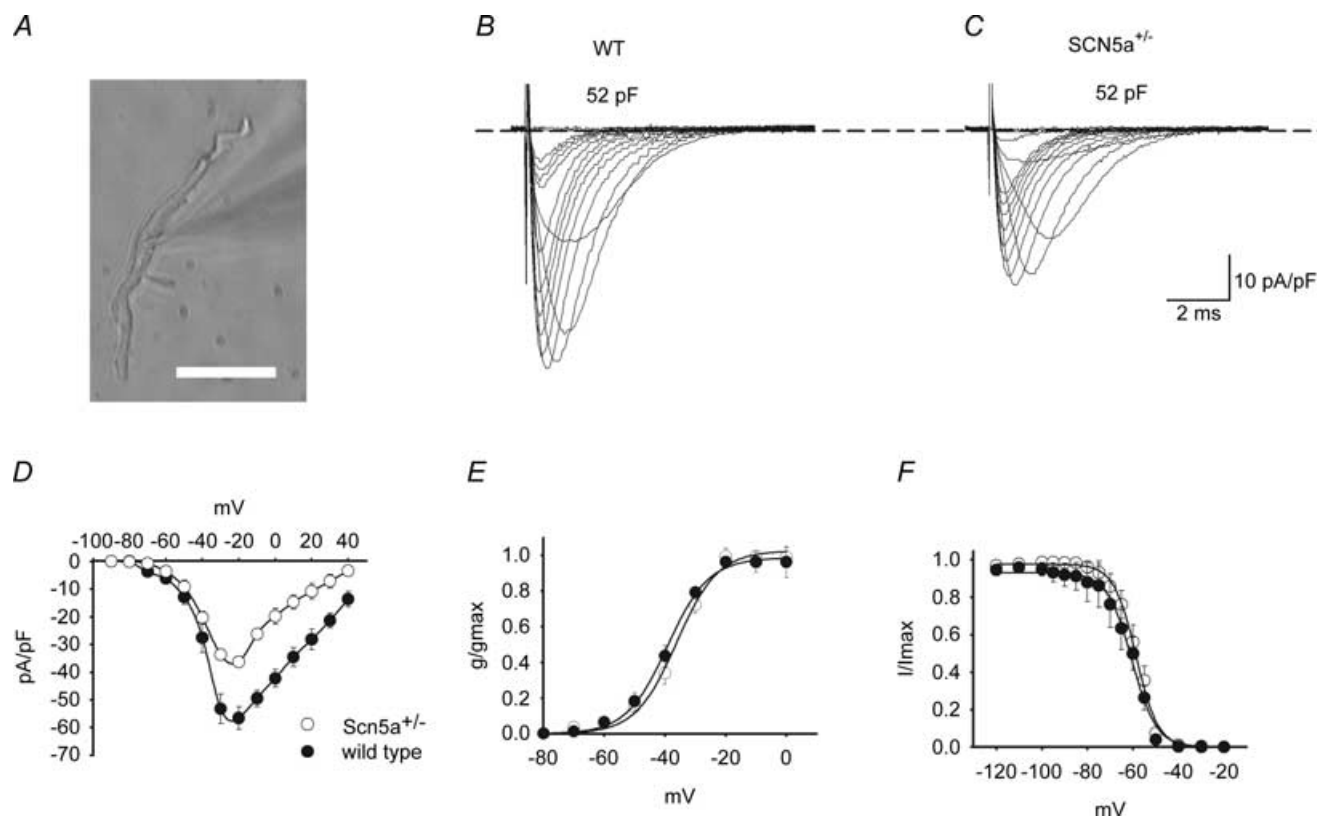


Figure 2. Activation and inactivation of *I*_{Na}

A, an example of typical mouse SAN pacemaker cell for patch clamping. Scale bar, 20 μ m. *B* and *C*, recordings of total *I*_{Na} in a WT and *Scn5a*^{+/-} cell. *D*, mean ($\pm$ S.E.M.) current–voltage relationships for total *I*_{Na} from WT ($n = 6$) and *Scn5a*^{+/-} cells ($n = 6$). *E* and *F*, mean ($\pm$ S.E.M.; $n = 6$ for each group) activation and inactivation curves for *I*_{Na}.

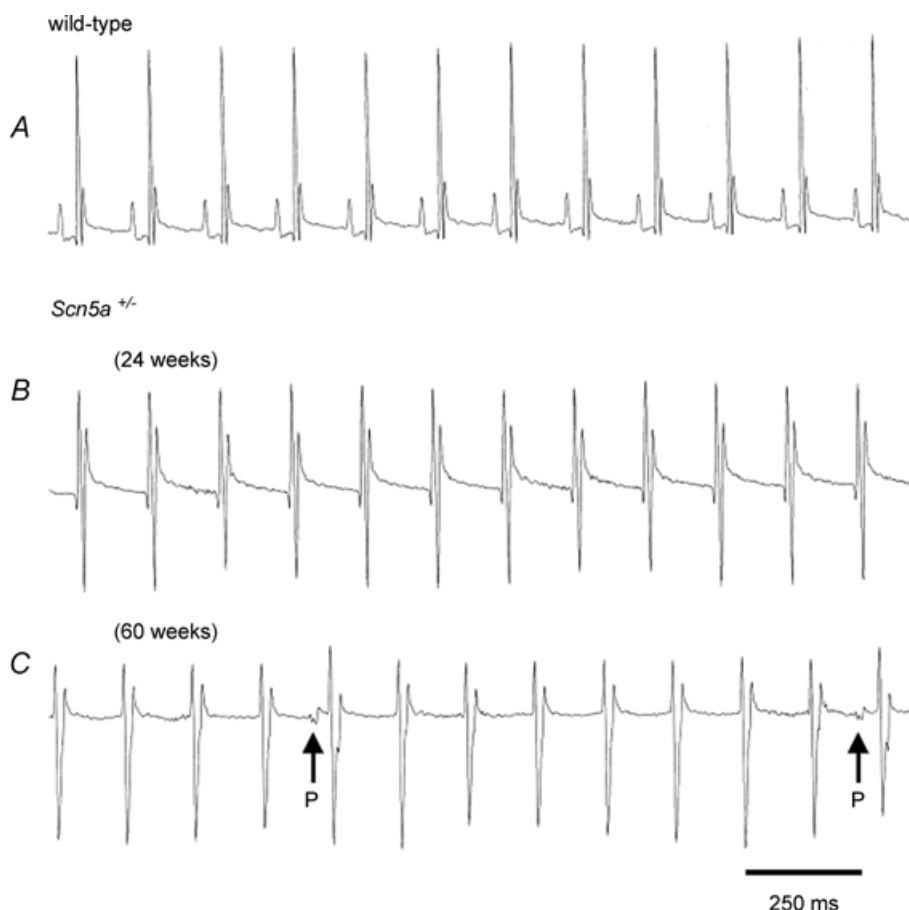
Table 1. Parameters of whole-cell Na⁺ current

Myocyte	Current density at -20 mV (pA/pF)	Steady-state activation		Steady-state inactivation	
		$V_{1/2}$	k	$V_{1/2}$	k
WT	57 ± 4 ($n = 6$)	-41 ± 1	5 ± 1 ($n = 6$)	-61 ± 4	4 ± 1 ($n = 6$)
Scn5a ^{+/-}	36 ± 1 ($n = 6$)**	-37 ± 1	6 ± 1 ($n = 6$)	-57 ± 2	3 ± 1 ($n = 6$)

Steady-state activation and inactivation curves were fitted to a Boltzmann equation, G (or I) = G_{max} (or I_{max})/[1 + exp{(V_m - V_{1/2})/k}]. V_{1/2} is voltage of half-maximal activation/inactivation, and k is the slope factor. ** $P < 0.01$ versus WT.

confirms that the values of the independent variate C_m explored through the two data sets were not significantly different ($P > 5\%$; unpaired t test). However, WT and Scn5a^{+/-} gave significantly different fitted slopes to a $P < 0.1\%$ significance level in the dependence of cycle length (CL), maximum upstroke velocity (MUP), and action potential amplitude (APA), but not maximum diastolic potential (MDP) or the diastolic depolarization rate (DDR), upon C_m consistent with earlier reports

in which tetrodotoxin (TTX)-mediated Na⁺ channel block did not influence electrical activity in small ball preparations from the centre, but influenced spontaneous activity (by ~50%) in preparations from rabbit SAN periphery without changing MDP (Kodama *et al.* 1997). There were thus significant contrasts between the two groups not simply attributable to quantitative anatomical differences between SAN cells in WT and Scn5a^{+/-} mice.

**Figure 3. ECG studies in WT and Scn5a^{+/-} mice**

Standard lead I surface ECG recordings obtained in anaesthetized WT (A) and Scn5a^{+/-} mice showing either complete (absence of P wave; first recording at 24 weeks old) (B) or partial (second recording at 60 weeks old) SA block with the presence of a few conducted atrial (P) waves (arrows) (C).

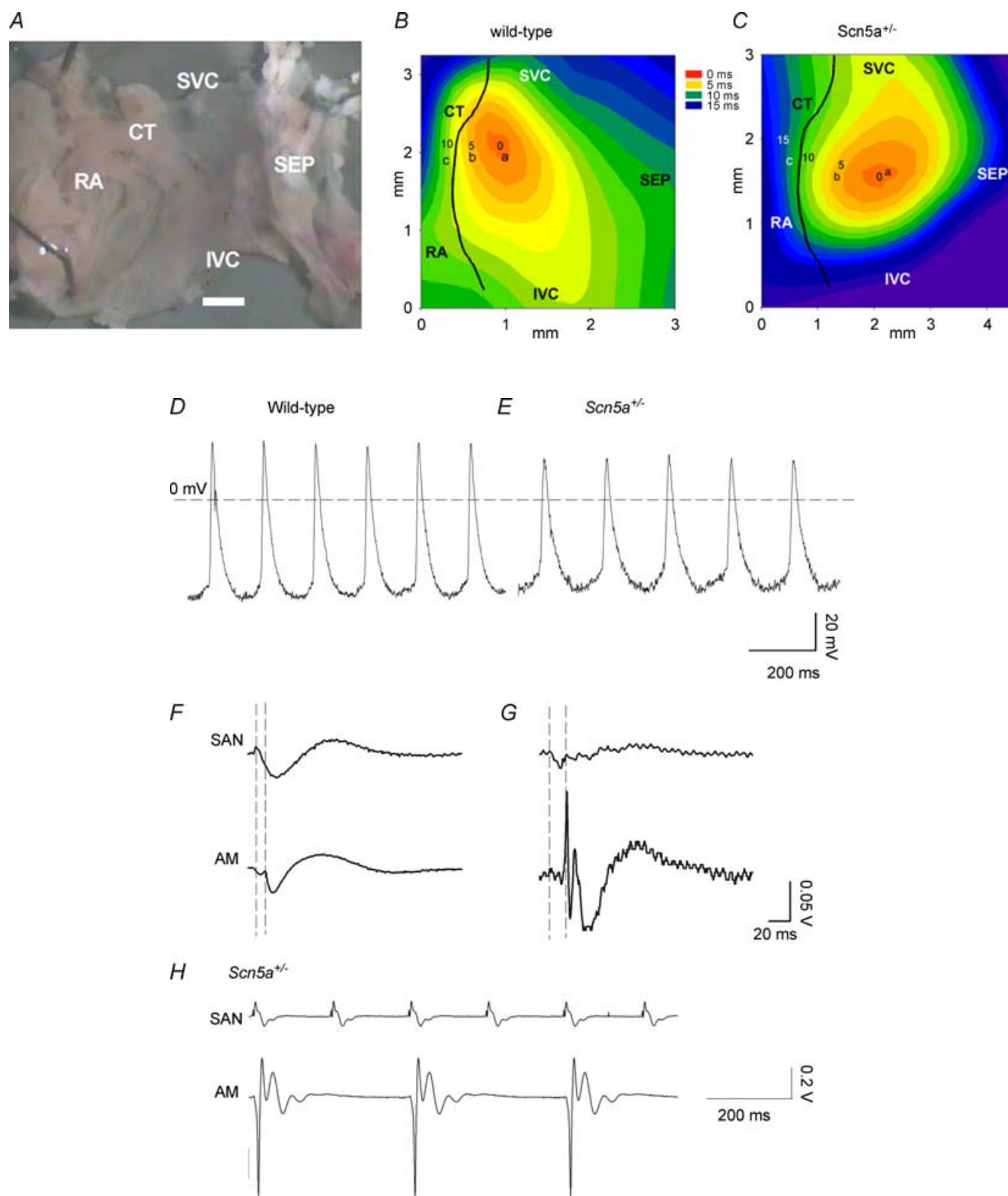


Figure 4. SAN pacemaking and conduction

A, an example of a SAN preparation used for the electrical mapping. Scale bar, 200 μ m. *B* and *C*, activation sequence in WT and a *Scn5a*^{+/-} SAN. *D* and *E*, action potentials recorded from the sites near the centre of the SAN in *A* and *B* are shown from WT (left) and *Scn5a*^{+/-} (right) SAN preparations. *F* and *G*, SAN conduction in WT and *Scn5a*^{+/-} preparations. Extracellular potentials from sites *a* (leading pacemaker site in the centre of the SAN);

I_{Na} facilitates SAN function in driving atrial activation

The present findings therefore directly implicate the $Na_v1.5$ channel in action potential conduction through the SAN and from the SAN to the surrounding atrial muscle. Preliminary modelling studies then suggested a possible mechanism that might explain the effect of $Na_v1.5$ channels upon the normal SAN pacemaker rate. Loss-of-function mutations in the Na^+ channel alone might then form the entire physiological basis for SND. The possible feasibility for such a scheme was explored numerically in a modified rabbit SAN model for pacemaker function comprising successively coupled cells from the SAN centre, which initiates spontaneous APs, to its periphery, that propagate such APs to reach atrial muscle, which is described in the Methods (Zhang *et al.* 2000). This predicted that a 35% block of i_{Na} in a 2 mm length of the peripheral part of the SAN, would result in a 41 ms increase in CL (316 ms in control *versus* 357 ms in the condition of a 35% block of peripheral i_{Na}) implying a significantly reduced pacemaker rate, and an 18.4 ms increase in SACT and reduction of conduction velocity (0.059 m s^{-1} in control *versus* 0.047 m s^{-1} in the condition of a 35% block of peripheral i_{Na}) corresponding to a compromised sino-atrial conduction. Figure 6A–E illustrates modelled AP waveforms in successive myocytes under control conditions (A), following a 100% reduction of i_{Na} confined to the SAN centre (B), and successive 35% (C), 70% (D) and 80% (E) reductions of i_{Na} selectively in the SAN periphery. These decrease pacemaker rate, as reflected in the time interval between successive APs (B), and decrease conduction velocity (C) to result in a conduction exit block in which APs originating from the SAN totally fail to conduct into the atrium (D) and finally a complete termination of SAN pacemaker activity (E).

Figure 7 illustrates an experimental fulfilment of such predictions. Thus, Fig. 7A shows extracellular potentials recorded from the centre of the SA node and from the neighbouring atrial muscle from a WT mouse. Such simultaneous recordings permitted SA node conduction time (time taken for conduction from points a to c in Fig. 4B and C) to be assessed. In such experiments, applications of 10 ($n = 5$) and 100 ($n = 5$) nM TTX caused no significant change of SA node conduction. However, increases in TTX concentration from 1 to $5 \mu\text{M}$ prolonged SA node conduction by 22 ± 7 and $39 \pm 4\%$ ($P < 0.01$, $n = 5$) in two male and three female WT mice and conduction by 30 ± 5 and $56 \pm 9\%$ ($P < 0.01$, $n = 5$) in two male and three female *Scn5a*^{+/-} mice. TTX at $12.5 \mu\text{M}$ completely blocked SA node conduction.

Discussion

The present experiments explored electrophysiological roles for cardiac *Scn5a*-encoded Na^+ channels in SAN function using mice with a targeted genetic disruption. They provide the *first* direct evidence implicating $Na_v1.5$ channels in action potential conduction through the SAN and from the SAN to surrounding atrial muscle and additionally suggest indirect roles for $Na_v1.5$ channels in maintenance of the normal SAN pacemaker rate. They thus corroborate indirect clinical evidence (Tan *et al.* 2001; Benson *et al.* 2003; Veldkamp *et al.* 2003) associating human genetic defects in *SCN5A* with sinus node disorders (SND). Analysis of mutant channels in stable mammalian cells demonstrated that 2 of 6 mutations associated with human congenital SND result in non-functional Na^+ channels with the remaining resulting in mild to severe channel dysfunction (Tan *et al.* 2001; Benson *et al.* 2003). Furthermore, the 1795insD, gain of function, mutation has been associated with sinus bradycardia and sinus pauses, in an inherited human long-QT syndrome (LQT3) that also shows phenotypic characteristics of SND (Veldkamp *et al.* 2003). Thus LQT3 Na^+ channel mutations causing persistent inward currents could result not only in QT prolongation but also sinus bradycardia and sinus pauses (Veldkamp *et al.* 2003). Both loss (Benson *et al.* 2003) and gain of function mutations (Veldkamp *et al.* 2003) in $Na_v1.5$ (*Scn5a*) might thus be implicated in sinus node dysfunction.

Our experiments first directly demonstrated the clinically observed sinus bradycardia, slow SA conduction and sino-atrial exit block following targeted genetic disruption of cardiac *Scn5a*-encoded Na^+ channels (Asseman *et al.* 1983), and went on to clarify possible roles for the *Scn5a* Na^+ channel in both conduction and pacing in the mouse SAN system for the first time. Thus both intact *Scn5a*^{+/-} mice and isolated *Scn5a*^{+/-} hearts showed depressed mean rates and persistent SA block. Both immunochemical and biophysical analyses demonstrated a reduced expression of SAN Na^+ channels: patch clamp studies of *Scn5a*^{+/-} SAN cells observed similar steady-state activation and inactivation properties but reduced maximum Na^+ currents ($\sim 30\%$) compared with findings from WT mice. Recent reports describe larger ($\sim 50\%$) reductions in i_{Na} in ventricular *Scn5a*^{+/-} myocytes (Papadatos *et al.* 2002). However, in contrast to ventricular myocytes, SAN cells express neuronal ($Na_v1.1$, $Na_v1.3$) (Maier *et al.* 2003) in addition to the adult cardiac *Scn5a*-encoded $Na_v1.5$ channel isoforms at relative densities that may vary with cell size (Lei

see B and C) and c (atrial muscle, AM) are shown. Vertical dashed lines indicate the time of initiation of the AP at the leading pacemaker site (left) and the arrival of the AP in the atrial muscle (right). H, simultaneous SAN and atrial muscle recordings showing sino-atrial conduction block in *Scn5a*^{+/-} SAN that was never observed in WT. SEP, septum; SVC, superior vena cava; IVC, inferior vena cava; CT, crista terminalis; and RA, right atrial appendage.

et al. 2004). Mouse SAN cells accordingly demonstrate separable, TTX-sensitive (neuronal) and TTX-resistant (cardiac) Na^+ currents and this could reconcile the apparent differences between the two cell types (Boyett *et al.* 2000; Maier *et al.* 2003; Lei *et al.* 2004). Although this presence of $\text{Na}_v1.1$ in the SAN has been reported in several species (Maier *et al.* 2003; Lei *et al.* 2004; Haufe *et al.* 2005), there is no report concerning its expression in human SAN.

Secondly, comparisons of mouse SAN preparations suggested specific roles for *Scn5a*-encoded Na^+ channels in SAN conduction and pacemaking. The presence or otherwise of $\text{Na}_v1.5$ channels strongly influenced both upstroke velocity and APA. Correspondingly, although multiple extracellular recordings revealed similar overall activation patterns over the SAN and surrounding atrial muscle, *Scn5a*^{+/-} hearts showed a slower conduction, both towards the SAN periphery and between SAN and atrium suggesting an SA exit block, giving rise to longer overall conduction times from the leading pacemaker site in the SAN centre to the surrounding atrial muscle, than in WT.

Furthermore some *Scn5a*^{+/-} but no WT SANs showed SA conduction block.

Thirdly, the present findings permitted a hypothesis in which cells containing cardiac *Scn5a*-encoded Na^+ channels influenced pacemaker rate through their electrical coupling to primary pacemaker cells in the SAN centre. Thus, *Scn5a*^{+/-} hearts showed a slowed SAN pacemaker activity. This implicates i_{Na} in the bradycardia observed in both experimental and clinical conditions. Microelectrode AP recordings from sites near the centre of intact *Scn5a*^{+/-} SAN preparations showed longer cycle lengths than did WT. Furthermore, 3 out of 8 *Scn5a*^{+/-}, but none of the WT, preparations showed a 3:2 or 2:1 SA conduction block. Furthermore, isolated WT and *Scn5a*^{+/-} SAN cells showed contrasting correlations between cycle length, maximum upstroke velocity and AP amplitude, all characteristics related to spontaneous pacemaker activity, and cell size.

In contrast, disruption of *Scn5a*-encoded cardiac Na^+ channels did not affect MDP (Fig. 5), findings that parallel previous reports (Kodama *et al.* 1997; Lei *et al.* 2004) that

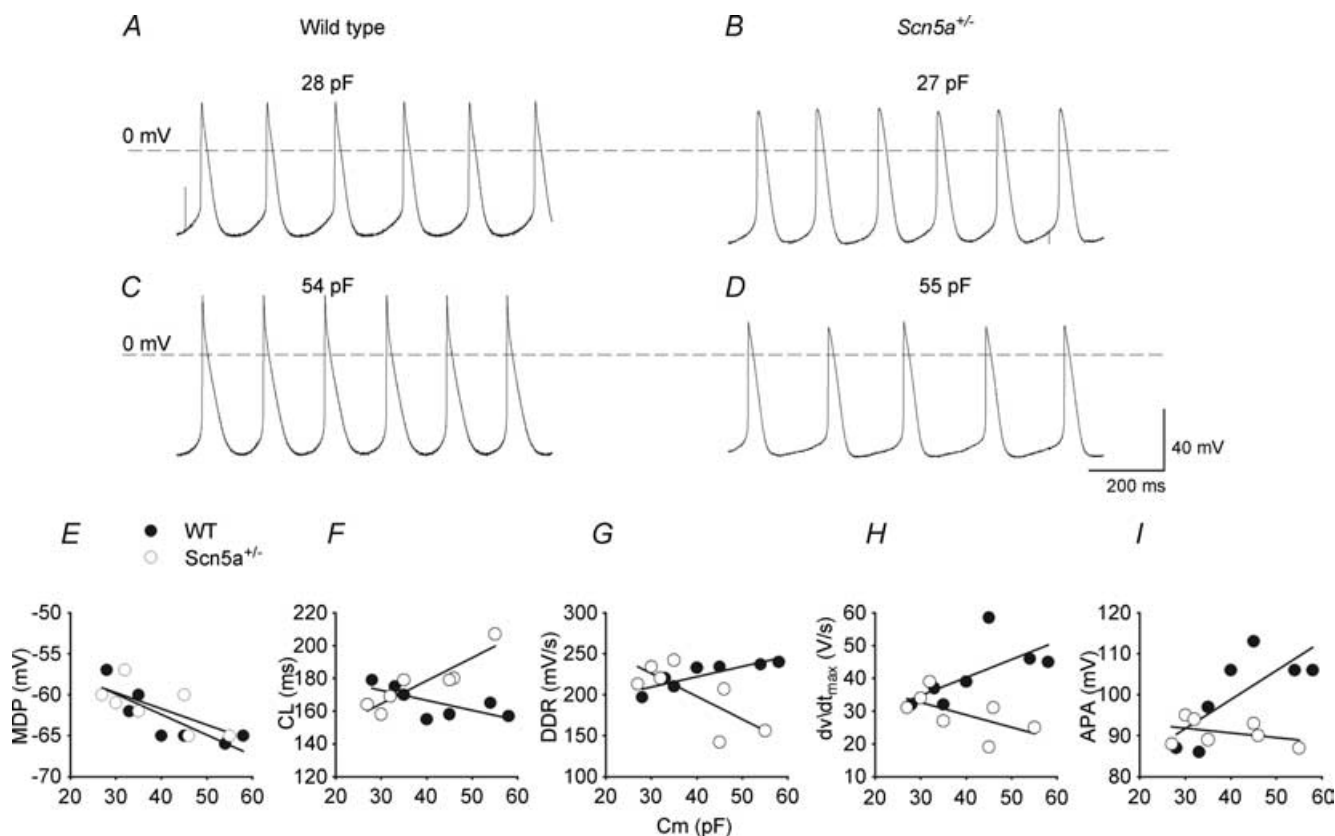


Figure 5. Spontaneous action potentials of SAN cells

A and B, spontaneous APs recorded in WT (A and C) and *Scn5a*^{+/-} cells (B and D). E–I, relationship between maximum diastolic potential (MDP), cycle length (CL), diastolic depolarization rate (DDR), maximum upstroke velocity (dv/dt) and AP amplitude (APA), and cell size as reflected in cell capacitance C_m from WT ($n = 7$) and *Scn5a*^{+/-} ($n = 7$) SAN cells.

implicate Nav1.5 (TTX-resistant) currents in pacemaker action potentials, but not MDP in single SAN cells: block of both TTX-sensitive and -resistant i_{Na} by $30 \mu\text{M}$ TTX reduced the slope of the pacemaker potential and the threshold potential and increased cycle length without changing MDP (Lei *et al.* 2004). TTX similarly spared electrical activity in small ball preparations from the centre but decreased take-off potential and upstroke velocity and slowed spontaneous activity (by $\sim 50\%$;) in balls from the periphery of rabbit SAN without changing MDP (Kodama *et al.* 1997), findings consistent with a higher i_{Na} expression in peripheral node cells (Honjo *et al.* 1996; Lei *et al.* 2004). Our results also correlated Nav1.5 current densities with

cell capacitance in WT but not Scn5a^{+/-} cells localizing the decreased Nav1.5 expression to peripheral SAN cells in Scn5a^{+/-} mice. Finally, pacemaker rates in Scn5a^{+/-} SAN resembled those of WT in small myocytes but were slower than those of WT in large myocytes.

Previous studies reported that cells from the centre of the rabbit SAN had more positive take-off potentials, slower upstrokes, longer durations in their action potentials, less negative maximum diastolic potentials, and slower intrinsic pacemaker activity than cells from the periphery (Bleeker *et al.* 1980; Kodama & Boyett, 1985; Kodama *et al.* 1997; Boyett *et al.* 1999. We have suggested that these regional differences in electrical activity can be

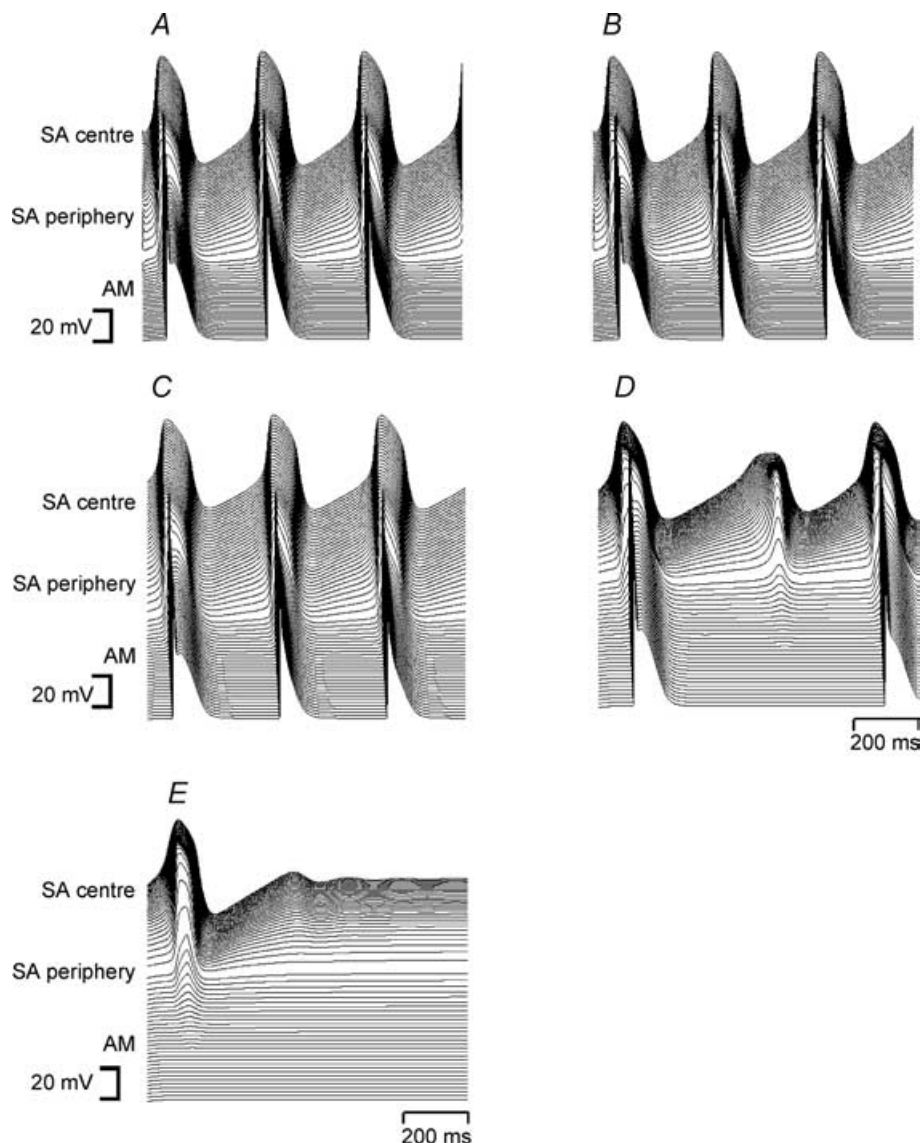


Figure 6. One-dimensional model of the SAN

A, APs displayed along the length of SAN and atrial string. The AP is first initiated in the SAN centre then propagates via its periphery towards atrium. B, effect of selectively blocking i_{Na} in the SAN centre by 100% increases CL by 11 ms compared with the control. C–E, APs with progressive selective reductions of i_{Na} in peripheral SAN by 35% (C), 70% (D) and 80% (E). AM, atrial muscle.

attributed to regional differences in the intrinsic properties of their contained cells. Thus: (1) single SAN cells from the rabbit show parallel heterogeneities in action potential characteristics (Honjo *et al.* 1996). Furthermore (2) cell size increases from the SAN centre to its periphery (Bleeker *et al.* 1980; Masson-Pévet *et al.* 1984; Oosthoek *et al.* 1993; Boyett *et al.* 2000), and (3) the smaller cells show electrical activity that resembles that in the SAN centre whereas electrical activity in (4) the larger cells closely parallels that observed in the SAN periphery (Honjo *et al.* 1996). (5) We have recently suggested (Liu *et al.* 2004) that the mouse SAN closely resembles the SAN in other small mammals in structure (Bleeker *et al.* 1980; Opthof *et al.* 1987; Boyett *et al.* 2000; Dobrzynski *et al.* 2005). It differs histologically from the surrounding myocardium in its greater nuclear density and a lighter cytoplasmic staining and shows a gradient in cell size, arrangement, orientation and connective tissue content from centre to periphery. In particular (6) cell size increases from centre to periphery as expected from the gradient model of SAN organization (Boyett *et al.* 2000). These studies relate differences in ionic currents densities with cell size to the regional differences

in electrical activity within the mouse SAN in the present experiments (Honjo *et al.* 1996, 1999; Lei *et al.* 2000).

Earlier work had not considered possible roles for i_{Na} in normal or abnormal SAN pacemaker function: micromolar levels of TTX abolishes activity in the SAN periphery, but not its centre (Lei *et al.* 2004) suggesting that the AP upstroke in the SAN periphery only depends on i_{Na} whereas the AP upstroke at its centre depends instead on $i_{Ca,L}$ (Kodama *et al.* 1997). Nevertheless, some recent reports suggest an involvement of cardiac i_{Na} . Thus, both intact Langendorff-perfused mouse *Scn5a*^{+/-} hearts (Papadatos *et al.* 2002) and patients with *SCN5A*-linked hereditary Lenègre disease (Probst *et al.* 2003) are bradycardic. Furthermore, increasing cell-cell electrotonic coupling progressively converts independent pacemaker behaviour in rabbit SAN cells to a situation in which SAN and atrial AP frequencies and waveforms became entrained (Verheijck *et al.* 1998). Besides altering AP conduction in the SAN, decreased AP upstroke velocities might then both affect SAN–atrial coupling as well as depress rhythmic activity in the central pacemaker cells themselves. This hypothesis was tested by a numerical

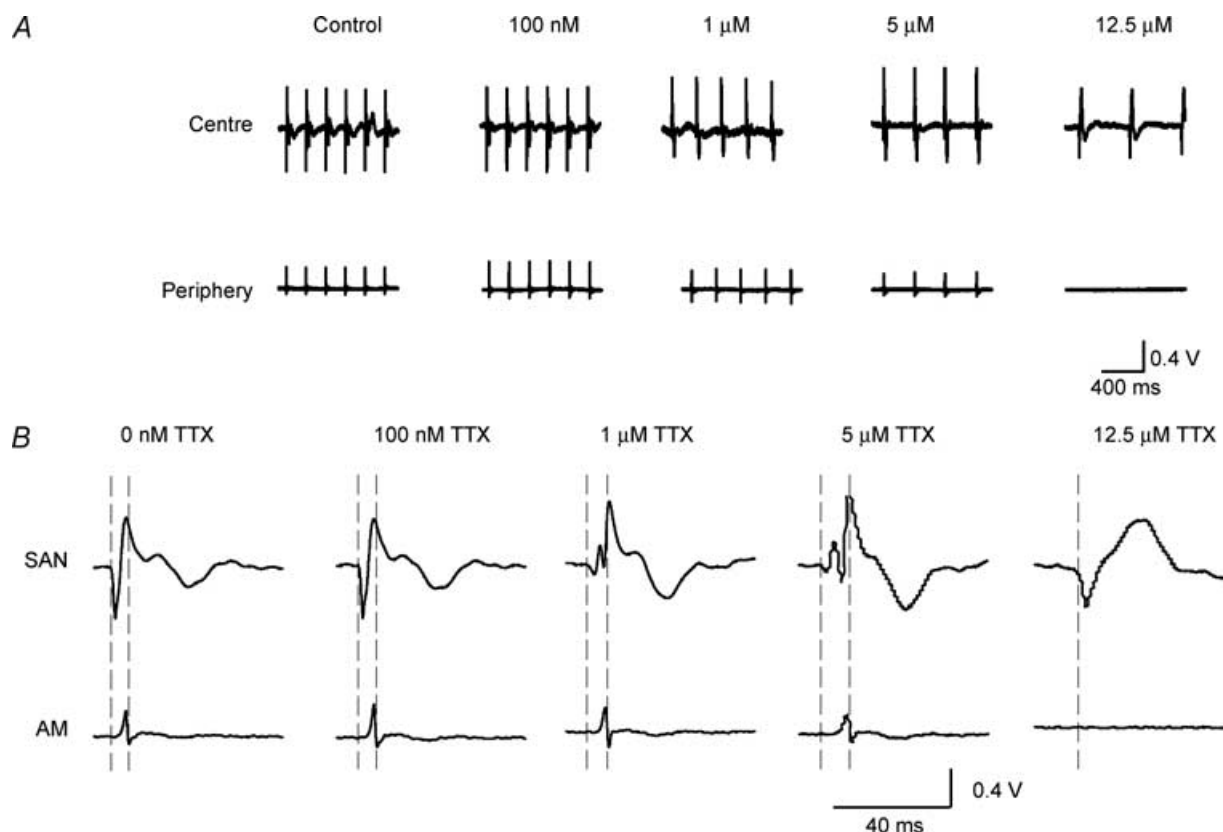


Figure 7. Effect of TTX on SAN pacemaking and conduction in WT mice

A, effect of TTX on SA node pacemaking. Extracellular potentials recorded from centre of the SAN and periphery of the SAN. *B*, effect of TTX on sinoatrial conduction. Vertical dashed lines indicate the time of initiation of the action potential at the leading pacemaker site (left) and the arrival of the action potential in the periphery or atrial muscle (right).

modelling of the initiation and propagation of SAN activity (Zhang *et al.* 2000) which assumed a constant density of TTX-sensitive Na⁺ channels in central SAN cells and a positive gradient of TTX-resistant channel densities from the SAN periphery to its boundary with atrial muscle. This analysis predicted that reducing i_{Na} density either in the SAN centre or its periphery significantly decreased pacemaker rate. Reductions in i_{Na} restricted to the SAN periphery, progressively resulted in decreased SAN conduction velocity, an exit block of AP conduction from SAN totally to atrium, and finally a complete termination of SAN pacemaker activity. Such findings corroborate recent reports that block of neuronal Na⁺ channels by TTX concentrations (~100 nM) sufficient to inhibit at least 90% of the Na_v1.1 channels (K_D , 1–10 nM) reduced heart rate by ~65% as assessed in intact heart (Maier *et al.* 2003), 25% in intact SANs (Lei *et al.* 2004) and 15% in isolated SAN cells (Lei *et al.* 2004).

Our findings following targeted heterozygous disruption of *Scn5a* thus directly implicate Na_v1.5 channel currents in the conduction of APs through the SAN and from the SAN to atrial muscle and they suggest that these also have indirect effects in the maintenance of normal SAN pacemaker rhythm and rate. Disruption of *Scn5a* channels appears, firstly, to reduce pacemaker potentials through a mechanism that involves the coupling of electrical events between pacemaker cells and cells surrounding them within the SAN: the resulting impairment of impulse initiation accounts for the observed sinus bradycardia. It also affects impulse propagation through the SAN and between the SAN and atria that may result in conduction block. Thus our findings from the *Scn5a*^{+/-} mouse SAN model provide a background for further explorations seeking to clarify the role of cardiac-type Na⁺ channels in normal SAN function in other mammalian (including human) species, for which an understanding of the pathophysiology of SND, the most common indication for pacemaker prescription, might offer potential alternative targets for its clinical management.

References

- Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA & Nademanee K (2003). Brugada syndrome: 1992–2002. A historical perspective. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1665–1671.
- Asseman P, Berzin B, Desry D, Vilarem D, Durand P, Delmotte C, Sarkis EH, Lekieffre J & Thery C (1983). Persistent sinus nodal electrograms during abnormally prolonged postpacing atrial pauses in sick sinus syndrome in humans: sinoatrial block vs overdrive suppression. *Circ Res* **68**, 33–41.
- Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH & George AL Jr (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* **112**, 1019–1028.
- Bleeker WK, Mackaay AJ, Masson Pevet M, Bouman LN & Becker AE (1980). Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circ Res* **46**, 11–22.
- Bogdanov KY, Vinogradova TM & Lakatta EG (2001). Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* **88**, 1254–1258.
- Boyett MR, Honjo H & Kodama I (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* **47**, 658–687.
- Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R & Kodama I (1999). Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am J Physiol* **276**, H686–H698.
- Catterall WA (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13–25.
- Cho HS, Takano M & Noma A (2003). The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* **550**, 169–180.
- Dobrzynski H, Li J, Tellez J, Greener ID, Nikolski VP, Wright SE *et al.* (2005). Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation* **111**, 846–854.
- Goldin AL (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **63**, 871–894.
- Haufe V, Cordeiro JM, Zimmer T, Wu YS, Schiccitano S, Benndorf K & Dumaine R (2005). Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I_{Na} is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovas Res* **65**, 117–127.
- Honjo H, Boyett MR, Kodama I & Toyama J (1996). Correlation between electrical activity and the size of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **496**, 795–808.
- Honjo H, Lei M, Boyett MR & Kodama I (1999). Heterogeneity of 4-aminopyridine-sensitive current in rabbit sinoatrial node cells. *Am J Physiol* **45**, H1295–H1304.
- Irisawa H, Brown HF & Giles W (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* **73**, 197–227.
- Kodama I & Boyett MR (1985). Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflugers Arch* **404**, 214–226.
- Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H & Owen JM (1997). Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol* **272**, H2793–H2806.
- Kucera JP, Rohr S & Rudy Y (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res* **91**, 1176–1182.
- Lei M & Boyett MR (1998). Inhibition of transient outward current, i_{to} , by flecainide and quinidine in rabbit isolated sinoatrial node cells. *J Physiol* **511P**, 78–79P.
- Lei M, Cooper P, Camelliti P & Kohl P (2002). Contribution of the fast sodium inward current, i_{Na} , to murine sino-atrial node pacemaking. *Biophys J* **82**, 605a.
- Lei M, Honjo H, Kodama I & Boyett MR (2000). Characterisation of the transient outward K⁺ current in rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *Cardiovasc Res* **46**, 433–441.

- Lei M, Honjo H, Kodama I & Boyett MR (2001). Heterogeneous expression of expression of the delayed-rectifier K^+ currents $i_{K,r}$ and $i_{K,s}$ in rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol* **535**, 703–714.
- Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS-M, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SKG, Noble D & Boyett MR (2004). Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol* **559**, 835–848.
- Liu J, Dobrzynski H, Boyett MR & Lei M (2004). Sophisticated structural organization is required for normal functioning of murine sinoatrial node. *Biophys J* **86**, 297a.
- Maier SK, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T & Catterall WA (2002). An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4073–4078.
- Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA & Scheuer T (2003). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3507–3512.
- Malhotra JD, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, Brosius FC, Kass RS & Isom LL (2001). Characterization of sodium channel α - and β -subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* **103**, 1303–1310.
- Mangoni ME & Nargeot J (2001). Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* **52**, 51–64.
- Masson-Pevet MA, Bleeker WK, Besselsen E, Treytel BW, Jongsma HJ & Bouman LN (1984). Pacemaker cell types in the rabbit sinus node: a correlative ultrastructural and electrophysiological study. *J Mol Cell Cardiol* **16**, 53–63.
- Mitsuiye T, Shinagawa Y & Noma A (2000). Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res* **87**, 88–91.
- Musa H, Lei M, Honjo H, Kodama I & Boyett M (2002). Heterogeneous expression calcium handling proteins in the pacemaker cells of the rabbit. *J Histochem Cytochem* **2002**, 311–324.
- Nathan RD (1986). Two electrophysiologically distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol* **250**, H325–H329.
- Oosthoek PW, Viragh S, Mayen AE, Van Kempen MJ, Lamers WH & Moorman AF (1993). Immunohistochemical delineation of the conduction system. I: The sinoatrial node. *Circ Res* **73**, 473–481.
- Ophhof T, De Jonge B, Jongsma HJ & Bouman LN (1987). Functional morphology of the mammalian sinuatrial node. *Eur Heart J* **8**, 1249–1259.
- Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K *et al.* (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6210–6215.
- Pawley JB (1990). Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, NY.
- Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA & Vetterling WT (1986). Numerical recipes. In *The Art of Scientific Computing*, pp. 523–528. Cambridge University Press, Cambridge.
- Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Mialet G, Demolombe S, Schott JJ, Baro I, Escande D & Le Marec H (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol* **41**, 643–652.
- Tan HL, Bink Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort Krol GC, Van Tintelen PJ, Van Den Berg MP, Wilde AA & Balser JR (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* **409**, 1043–1047.
- Veldkamp MW, Wilders R, Baartscheer A, Zegers JG, Bezzina CR & Wilde AA (2003). Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families. *Circ Res* **92**, 976–983.
- Verheijck EE, Van Kempen MJA, Mike Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ & Bouman LN (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res* **52**, 40–50.
- Verheijck EE, Wilders R, Joyner RW, Golod DA, Kumar R, Jongsma HJ, Bouman LN & Van Ginneken AC (1998). Pacemaker synchronization of electrically coupled rabbit sinoatrial node cells. *J General Physiol* **111**, 95–112.
- Yamamoto M, Honjo H, Niwa R & Kodama I (1998). Low-frequency extracellular potentials recorded from the sinoatrial node. *Cardiovasc Res* **39**, 360–372.
- Yu FH & Catterall WA (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**, 207.
- Zhang H, Holden AV, Kodama I, Honjo H, Lei M, Varghese T & Boyett MR (2000). Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol* **279**, H397–H421.

Acknowledgements

This work was supported by the Wellcome Trust (M.L., C. L.-H.H.), the British Heart Foundation (A.A.G., C.L.-H.H.), the Medical Research Council (A.A.G., W.H.C., C.L.-H.H.), the Leverhulme Trust (W.H.C., C.L.-H.H.), the Ford Physiology Fund (W.H.C.), the Engineering and Physical Sciences Research Council (H.G.Z.), in the United Kingdom, INSERM and the ACI 'Biologie du développement et physiologie intégrative' from the Ministère de la Recherche (F.C.), France, the National Health and Medical Research Council (J.I.V.) and National Heart Foundation (J.I.V.) in Australia and a Chinese National Nature Science Foundation Grant (Ref. 30470634 M.L.), in the People's Republic of China.

Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*

Ming Lei, Catharine Goddard, Jie Liu, Anne-Laure Léoni, Anne Royer, Simon S.-M. Fung, Guosheng Xiao, Aiqun Ma, Henggui Zhang, Flavien Charpentier, Jamie I. Vandenberg, William H. Colledge, Andrew A. Grace and Christopher L.-H. Huang

J. Physiol. 2005;567;387-400; originally published online Jun 2, 2005;

DOI: 10.1113/jphysiol.2005.083188

This information is current as of July 18, 2006

**Updated Information
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:
<http://jp.physoc.org/cgi/content/full/567/2/387>

Permissions & Licensing

Information about reproducing this article in parts (figures, tables)
or in its entirety can be found online at:
<http://jp.physoc.org/misc/Permissions.shtml>

Reprints

Information about ordering reprints can be found online:
<http://jp.physoc.org/misc/reprints.shtml>

2. Résultats

L'immunomarquage de sections tissulaires du nœud sinusal avec des anticorps anti Na_v1.5 a révélé une forte diminution du marquage chez les souris Scn5a^{+/-} par rapport aux souris WT. Cette diminution était nette à la fois dans le nœud sinusal et le tissu atrial (Figure 1, article 2, page 106). Le marquage chez les souris WT a révélé la présence préférentielle de la sous-unité Na_v1.5 dans la zone périphérique du nœud sinusal et dans le tissu atrial bordant. L'immunomarquage de la sous-unité Na_v1.1 était similaire dans les deux groupes de souris, et était retrouvé sur l'ensemble du nœud sinusal.

Cette diminution de l'expression de la sous-unité Na_v1.5 était en accord avec la densité réduite du courant I_{Na} enregistré à partir de cardiomyocytes isolés du nœud sinusal de souris Scn5a^{+/-}, par rapport à celle mesurée chez des souris WT (Figure 2, article 2, page 106).

Afin d'étudier les conséquences physiologiques de la diminution du courant sodique dans le nœud sinusal, nous avons réalisé des enregistrements électrocardiographiques chez des souris vigiles. Les souris Scn5a^{+/-} avaient une fréquence cardiaque diminuée de 8% (546±24 bpm ; n=6) par rapport aux souris WT (592±17 bpm ; n=5 ; p<0.01). Les variations nycthémerales de fréquence cardiaque étaient conservées chez les souris Scn5a^{+/-} (Figure 34, page 108).

Une étude qui a suivi celle publiée dans cet article a confirmé la bradycardie observée chez les souris Scn5a^{+/-}, et mis en évidence que la bradycardie était présente uniquement en période d'activité. En effet, la durée moyenne de l'intervalle RR mesuré en période de nuit était de 106±2 ms chez des souris Scn5a^{+/-} tandis qu'elle était de 98±1 ms chez les souris WT (n=6 dans chaque groupe, p<0.05). En période de jour, la durée moyenne de l'intervalle RR était de 125±1 ms chez les souris Scn5a^{+/-} contre 122±4 ms chez les souris WT.

Parralèlement, nous avons réalisé des ECG sous anesthésie, et des épisodes de bloc sino-atrial persistant ont pu être identifiées chez 2 souris Scn5a^{+/-} (sur 67) alors qu'aucune souris WT (n=57) n'a montré de telles anomalies (Figure 3, article 2, page 106). Le bloc sino-atrial pourrait être une manifestation extrême des anomalies sinusales observées chez les souris Scn5a^{+/-}.

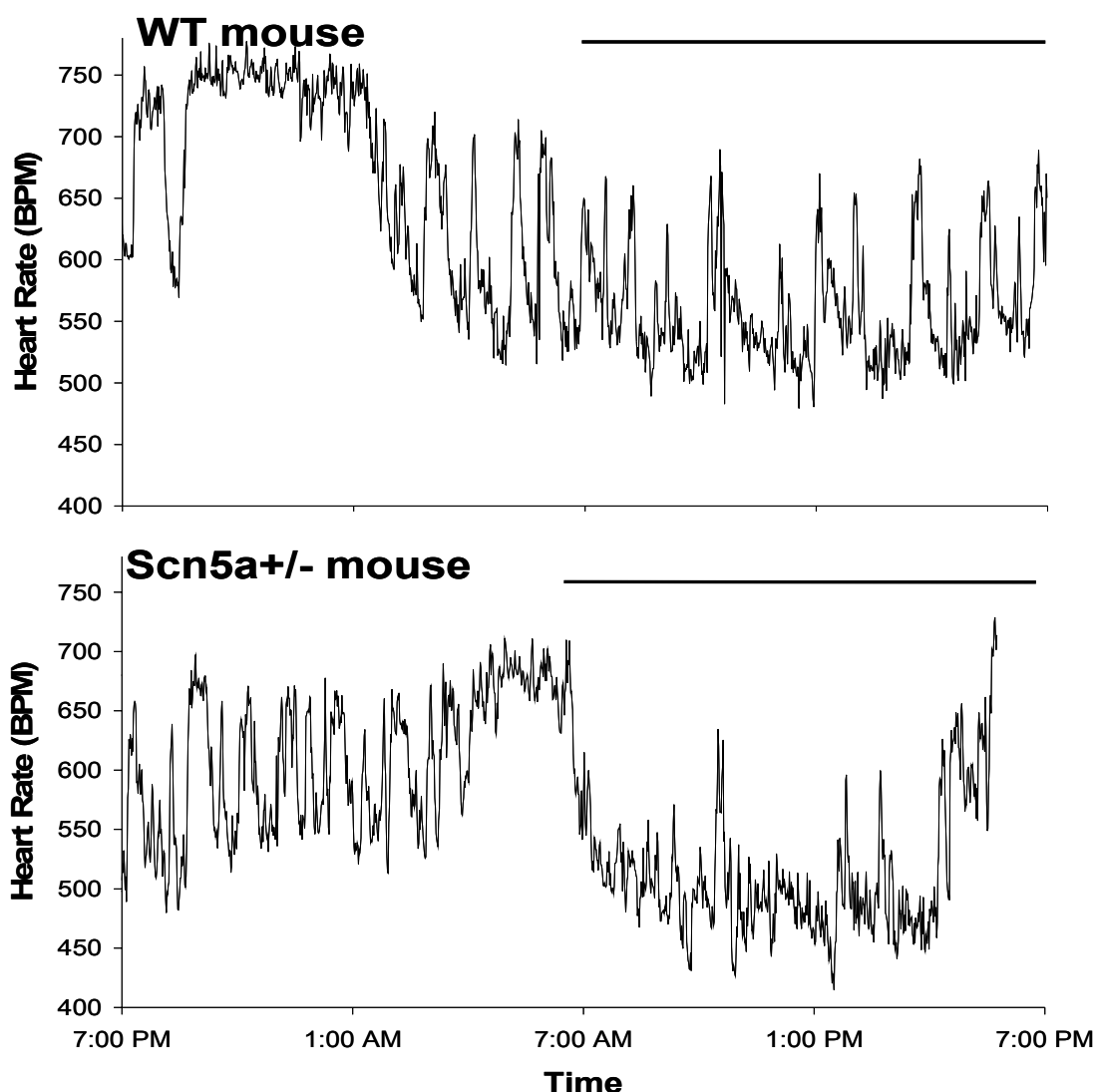


Figure 34 : Variations de fréquence cardiaque sur 24h chez une souris sauvage (WT) et une souris Scn5a^{+/-}. La barre noire représente la période d'éclairage de l'animalerie.

La diminution de fréquence cardiaque observée chez les souris Scn5a^{+/-} était corrélée à un ralentissement de la fréquence de battement des préparations sinusales isolées (Figure 4 D et E, article 2, page 106). La carte d'activation du nœud sinusal a révélé une séquence d'activation similaire entre les souris WT et Scn5a^{+/-} (Figure 4 B et C, article 2, page 106). Toutefois, la conduction était plus lente à la périphérie du nœud sinusal chez les souris Scn5a^{+/-} et au niveau de la jonction nœud sinusal-tissu atrial, reflétant un bloc de sortie en périphérie.

Afin d'explorer la diminution de fréquence de battement des préparations sinusales chez les souris Scn5a^{+/-}, la fréquence de battement des cellules sinusales isolées a été mesurée. Pour cela, une distinction a été faite entre les cellules de petite taille supposées centrales et les grosses cellules périphériques. Chez les souris Scn5a^{+/-}, seules les cellules périphériques (qui expriment la sous-unité Na_v1.5) avaient une fréquence de battement

diminuée, tandis que la fréquence des cellules centrales était similaire à celle mesurée sur les cellules sinusales centrales des souris WT (Figure 5 A à D, article 2, page 106).

L'enregistrement simultané de potentiels extracellulaires au centre du nœud sinusal et sur le muscle atrial bordant permet de mesurer le temps de conduction du nœud sinusal. Lors de l'application de TTX à dose croissante, le temps de conduction du nœud sinusal s'allongeait chez les souris WT et *Scn5a*^{+/-}. A la dose de 12.5 μ M, la conduction dans le nœud sinusal était totalement inhibée chez les souris WT (Figure 7, article 2, page 106). Par ailleurs, ce type d'enregistrement a permis de mettre en évidence des blocs de sortie du nœud sinusal vers le tissu atrial chez les souris *Scn5a*^{+/-} (Figure 4H, article 2, page 106), phénomène jamais observé chez les souris WT.

3. Discussion - Conclusion

Cette étude constitue la première démonstration *in vivo* du rôle des canaux sodiques $\text{Na}_v1.5$ dans la propagation du potentiel d'action au sein du nœud sinusal, et de ce dernier au tissu atrial environnant. Par ailleurs, cette étude fournit la preuve d'un rôle indirect des canaux $\text{Na}_v1.5$ dans le maintien de l'activité *pacemaker* normale du nœud sinusal. Ce travail confirme donc l'hypothèse, qui avait été avancée lors de la découverte de mutations du gène *SCN5A* chez des patients présentant une dysfonction sinusale, selon laquelle ces canaux participeraient à l'automatisme cardiaque (Benson *et al.*, 2003 ; Veldkamp *et al.*, 2003).

A la fois *in vivo* chez l'animal entier, et *ex vivo*, sur des cœurs isolés, la fréquence cardiaque était diminuée chez les souris *Scn5a*^{+/-} et des blocs de conduction sinoatriale ont pu être identifiés. La diminution de fréquence cardiaque observée était modérée, d'environ 8%. De manière intéressante, cette réduction venait plus d'une diminution de la fréquence cardiaque en période de nuit (d'activité), laissant supposer une possible altération de la balance sympathovagale chez les souris *Scn5a*^{+/-}. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse temporelle et spectrale de la variabilité de l'intervalle RR chez ces animaux. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence, que ce soit en période de jour ou en période de nuit. En accord avec ces résultats, à ce jour, aucun mécanisme de régulation des canaux $\text{Na}_v1.5$ par le tonus adrénergique ou vagal n'est connu dans le nœud sinusal. Seule la régulation de ces canaux dans le tissu ventriculaire lors d'une stimulation adrénergique est rapportée. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques induit une augmentation du courant I_{Na} par augmentation de l'amplitude du courant (Yarbrough *et al.*, 2002). Il serait intéressant de mener des expériences sur des cellules sinusales isolées

afin de déterminer les effets d'une application d'isoprénaline ou d'acétylcholine sur le courant sodique.

Alors que les canaux $\text{Na}_v1.5$ sont exprimés au centre du nœud sinusal chez le lapin nouveau né, ils disparaissent à l'âge adulte (Baruscotti *et al.*, 1996). Cette différence pourrait rendre compte du ralentissement de la fréquence cardiaque chez les animaux adultes et une diminution des canaux $\text{Na}_v1.5$ chez l'homme pourrait aussi se produire avec le vieillissement et expliquer le ralentissement de la fréquence cardiaque avec l'âge (Boyett *et al.*, 2000). Toutefois, d'autres hypothèses sont aussi avancées, comme la diminution du nombre de cellules *pacemaker* et l'augmentation du tissu conjonctif (Lakatta & Sollott, 2002). L'étude de la fréquence cardiaque à un âge précoce et tardif chez des souris WT et $\text{Scn5a}^{+/-}$ pourra peut être permettre de révéler la contribution des canaux $\text{Na}_v1.5$ dans le ralentissement âge-dépendant de la fréquence cardiaque.

B. Hétérogénéité phénotypique associée à une perte de fonction du gène SCN5A

1. Introduction

Comme évoqué précédemment, les mutations perte de fonction du gène *SCN5A*, qui code pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque, peuvent être associées à différentes pathologies cardiaques, comme le syndrome de Brugada (BrS) et la maladie de Lenègre (Kyndt *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2003). Les mutations identifiées dans ces pathologies entraînent une perte de fonction du canal, tandis que des mutations gain de fonction ont été associées au syndrome du QT long de type 3 (Napolitano *et al.*, 2003).

Chez les patients atteints de la maladie de Lenègre, la conduction de l'influx électrique cardiaque est anormalement lente et ce phénomène, qui s'aggrave avec l'âge, peut conduire à un bloc de conduction AV complet nécessitant l'implantation d'un stimulateur électronique (Probst *et al.*, 2003, Schott *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que la pénétrance est incomplète dans la maladie de Lenègre (Probst *et al.*, 2003). En effet, au sein d'une famille, une même mutation perte de fonction du gène *SCN5A* peut entraîner des troubles de conduction prononcés chez des patients, tandis qu'au même âge d'autres patients ont des paramètres ECG proches de ceux des membres sains de leur famille (Figure 26, page 72). L'expressivité des mutations perte de fonction du gène *SCN5A* est

également variable. En effet, une même mutation peut conduire au sein d'une famille à un phénotype de type syndrome de Brugada ou à la maladie de Lenègre (Kyndt *et al.*, 2001 ; Probst *et al.*, 2006). A ce jour, les mécanismes à l'origine de la pénétrance incomplète et de l'expressivité variable des mutations perte de fonction du gène *SCN5A* sont inconnus.

Un modèle de souris invalidées pour le gène *Scn5a* murin existe (Papadatos *et al.*, 2002). Ces souris présentent un ralentissement de la vitesse de conduction AV, augmentant avec l'âge de façon comparable à ce qui est observé chez les patients mutés *SCN5A* atteints de maladie de Lenègre (Royer *et al.*, 2005, Probst *et al.*, 2003). Les souris sauvages âgées ont une fibrose modérée du myocarde ventriculaire tandis que les souris hétérozygotes du même âge ont une fibrose importante du myocarde ventriculaire et une altération marquée de l'expression ventriculaire de la connexine 43. Aucune altération de la fonction contractile du myocarde n'a par ailleurs été mise en évidence. Ces observations ont tendance à corroborer l'hypothèse initiale de Lenègre et Lev de l'implication d'un processus de fibrose dans la pathogénie des troubles de conduction héréditaires (Royer *et al.*, 2005). Enfin, des données récentes indiquent que les vitesses de conduction enregistrées au niveau des branches du faisceau de His sont comparables chez les souris hétérozygotes *Scn5a*^{+/-} et les souris sauvages du même âge (van Veen *et al.*, 2005). Ceci montre qu'isolément la réduction de 50% du courant sodique (Papadatos *et al.*, 2002) et la fibrose liée au vieillissement affectent peu la conduction, tandis que la combinaison d'une expression réduite du canal sodique et du vieillissement s'accompagnent d'une fibrose myocardique importante et d'une désorganisation des jonctions communicantes conduisant à une altération sévère de la conduction.

Nous avons exploré ce modèle de souris afin de vérifier si une hétérogénéité phénotypique similaire à celle observée chez les patients porteurs de mutation perte de fonction sur *SCN5A* existait chez les souris *Scn5a*^{+/-} et quels pouvaient en être les déterminants moléculaires et fonctionnels.

Cette étude fait l'objet d'un manuscrit qui est prêt à être soumis à la revue *Circulation* (Leoni *et al.*, article 3, page 112).

Article 3

Variable Na_v1.5 protein expression is responsible for variable penetrance of ventricular conduction defects in *Scn5a*^{+/-} mice

Anne-Laure Leoni¹, Bruno Gavillet³, Jean-Sébastien Rougier³, Céline Marionneau¹, Vincent Probst^{1,2}, Connie Bezzina⁴, Solena Le Scouarnec¹, Jean-Jacques Schott¹, Sophie Demolombe¹, Patrick Bruneval⁵, Hervé Le Marec^{1,2}, Arthur AM Wilde⁴, Peter Mohler⁶, Hugues Abriel³, Andrew A Grace⁶, Denis Escande¹, Flavien Charpentier¹

¹ Inserm U533, l'Institut du Thorax, Faculté de Médecine, Nantes, France

² Clinique cardiologique, l'Institut du Thorax, CHU de Nantes, France

³ Department of Pharmacology and Toxicology, University of Lausanne, Switzerland

⁴ Department of Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

⁵ Département de Pathologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris V René Descartes, Paris, France

⁶ Cardiovascular Group, Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Prêt à être soumis

Summary

Background. Haploinsufficiency in *SCN5A*, the gene encoding the cardiac Na⁺ channel, has been associated with inherited Lenègre disease and Brugada syndrome (BrS). Both entities are characterized by variable penetrance of ventricular conduction anomalies. Mechanisms for this heterogeneity were investigated in inbred *Scn5a*^{+/-} mice.

Methods and results. In 10-week-old *Scn5a*^{+/-} mice, ECG recordings distinguished 2 subgroups: (i) one with a strong phenotype (QRS >20 ms); (ii) the other with a mild phenotype (QRS ranging 13-18 ms). The difference in phenotype was maintained over time up to 80 weeks. At 10 weeks, ajmaline (20 mg/kg IP) induced a similar QRS prolongation in both groups. In contrast, in old mice (>53 weeks), QRS prolongation was more pronounced in strong than in mild *Scn5a*^{+/-} mice. These data perfectly matched with ajmaline test performed in *SCN5A*-mutated patients with either strong (QRS>110 ms) or mild phenotype. Old strong *Scn5a*^{+/-} mice had an increased propensity to develop spontaneous ventricular tachycardia (5/10 vs 0/8 mild *Scn5a*^{+/-} mice). Correspondingly, symptomatic *SCN5A*-mutated Brugada patients were characterized by a longer QRS (118±4 ms; n=24) than asymptomatic patients (110±2 ms; p<.05; n=84) and had a more pronounced QRS enlargement after challenge with sodium blocker (37±5 ms vs 26±2 ms, p p<.05). Mice with a strong phenotype were also characterized by extensive cardiac fibrosis. *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype had higher Na_v1.5 protein expression from the remaining allele and larger I_{Na} current than *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype (82±7 vs 52±5 AU; p<.05, 103±10 AU in WT ; 59±7 vs 46±4 pA/pF; 103±7 pA/pF in WT).

Conclusion. We conclude that *Scn5a*^{+/-} mice show similar phenotype heterogeneity as *SCN5A*-mutated patients. *Scn5a*^{+/-} mice and patients with reduced conduction reserve are more prone to develop ventricular arrhythmias.

Key words: conduction, ion channels

Introduction

The voltage-gated sodium channel determines the upstroke velocity of the action potential and, in conjunction with gap junction channels and the organization of the collagenous skeleton, controls the conduction velocity of the cardiac electrical impulse. Haploinsufficiency in *SCN5A*, the gene encoding the pore-forming α -subunit of the main cardiac sodium channel, is responsible for the inherited form of the Lenègre disease^{1,2} (also called progressive cardiac conduction defect) and for the Brugada syndrome.^{3,4,5} In patients with inherited Lenègre disease, the conduction of the cardiac impulse is abnormally slow and becomes progressively slower with aging leading ultimately to atrioventricular block and pacemaker implantation in the elderly.² Conduction defects have also been reported in *SCN5A*-related Brugada syndrome patients^{6,7} and some *SCN5A* mutations may cause both diseases within the same family.⁸ As for most inherited electrical cardiac diseases, penetrance of the defect caused by *SCN5A* haploinsufficiency is variable among carriers of the same mutation, with patients showing strong conduction alterations and other exhibiting an almost normal phenotype.² This demonstrates that factors independent of the morbid gene exert considerable influence on outcome of the inherited channelopathy. One obvious possibility in humans is the contribution of “modifier genes”, which could control expressivity of the monogenic defect.⁹

A mouse model with targeted disruption in *Scn5a* has been established.¹⁰ At the homozygous state, mice are not viable and die before birth. In contrast, heterozygous *Scn5a* deficient (*Scn5a*^{+/-}) mice live and reproduce normally. In preceding articles,^{11,12} we showed that *Scn5a*^{+/-} mice convincingly recapitulate the Lenègre's disease phenotype including progressive impairment with aging of atrial and ventricular conduction. Because the progressive decline in conduction velocity associates with myocardial rearrangements and fibrosis, we provided the first demonstration that an isolated ion channel defect can lead to myocardial structural anomalies.¹¹ We also showed that the conduction defect preferentially concerns the right ventricle and resides in the ventricular myocardium rather than in the bundle branches.¹² In the present work, we went a step further and now demonstrate that: (i) the expressivity of the conduction anomalies is variable among *Scn5a*^{+/-} mice; (ii) *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype exhibit more myocardial rearrangements with

aging than mice with a mild phenotype; (iii) the conduction reserve is markedly reduced in old mice with a strong but not with a mild phenotype; (iv) old mice with a strong but not with a mild phenotype show spontaneous ventricular arrhythmias; (v) similarly, symptomatic Brugada patients carrying *SCN5A* mutations have more pronounced conduction disorders than asymptomatic patients; (vi) in mice, the expressivity of the conduction deficit correlates with the ability of the normal allele to produce different amount of functional Na_v1.5 channel proteins.

Methods

All mice of 129/Sv genetic background were generated and bred at l'*Institut du Thorax* (Nantes, France), and genotyped by polymerase chain reaction as previously described. The study conformed with the institutional guidelines for animal use in research. All experiments were performed on age-matched wild-type and heterozygous littermates.

Electrocardiography

Six-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.12.28, EMKA Technologies). Recordings were filtered between 0.5 and 250 Hz. Mice were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of etomidate (Hypnomidate[®], Janssen-Cilag, Belgium, 30 mg/kg). Body temperature was maintained at 37°C using a thermally controlled heating pad (Harvard Apparatus, France). Criteria used for measuring RR, PR, QRS, QT intervals, as well as P wave duration were previously reported. The QT interval was corrected for heart rate using the formula, $QT_c = QT / (RR/100)^{1/2}$ with QT and RR measured in ms.¹³

Pharmacological challenge with the Na⁺ channel blocker ajmaline (20 mg/kg, i.p.) was performed in 10 and > 53 week-old sedated mice. QRS interval lengthening was assessed 10 minutes after injection.

Real-time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of cardiac total RNA samples from ventricular preparations using High Capacity cDNA Archive Kit for RT-PCR (Applied Biosystems). On-line PCR was performed with pre-designed FAM-labeled fluorogenic TaqMan probes and primers and 1XTaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). After 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, 40 cycles of amplification were performed, each at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were collected with instrument-spectral compensation by the Applied Biosystems SDS 2.1 software. The fluorescence signals were normalized to the ubiquitously-expressed housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). The comparative threshold cycle (Ct) relative quantification method¹⁴ was used to compare the amounts of mRNA in WT and *Scn5a*^{+/-} mice. Each plate contained duplicate quantification for each gene.

TaqMan real-time RT-PCR

TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process to characterize the ion channel gene expression patterns of ventricular preparations from WT and *Scn5a*^{+/-} mice. First strand cDNA was synthesized from 220 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then carried out in Low Density Array using the AB PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each array were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed TaqMan probes and primers (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). The probes were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM, Applera Corp.) on the 5' end and with non-fluorescent quencher on the 3' end. The genes selected for their cardiac expression encode 68 ion channel α - and auxiliary subunits, seven proteins involved in calcium homeostasis, five transcription factors, specific markers of cardiac regions, vascular vessels, neuronal tissue, fibroblasts, inflammation and hypertrophy, and four endogenous control genes used for normalization. Two nanograms of cDNA combined with 1X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) were loaded into each well. The Low Density Arrays were thermal cycled at 50°C for 2 min and 94.5°C for 10 min, followed by 40 cycles of 97°C for 30 s and 59.7°C for 1 min. Data were collected with instrument spectral

compensations by the Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed using the threshold cycle (C_T) relative quantification method (Livak and Schmittgen, 2001). Data were normalized using an internal control gene. Genes with $C_T > 32$ were eliminated for lack of reproducibility. The outliers were excluded using a robust statistical modified z-score method based on the median of absolute deviation.¹⁵ The non-excluded values were used for the $2^{-\Delta C_T} \times 100$ calculation; $2^{-\Delta C_T}$ corresponds to the ratio of each gene expression versus internal control gene.

Histology

Cardiac arrest was obtained in sedated mice (etomidate, 30 mg/kg i.p.) with intravenous infusion of KCl 10%. After excision, hearts were rinsed in saline solution and fixed by immersion in 10% formalin for 24 h. Then, gross transversal sections were cut from the base to the apex and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin to assess any myocyte necrosis or interstitial inflammation or Sirius red to assess interstitial and scar fibrosis. Serial sections were cut to track the ventricular outflow tract. Semi quantitative assessment of fibrosis was determined based upon the extent and the number of interstitial fibrosis and scar foci (and scored 0 to 3).

Protein isolation and western blot

After excision, hearts were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Frozen mouse ventricle was transferred into lysis buffer (50 mM TRIS pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and Complete® protease inhibitor cocktail from Roche). Tissues were then homogenized using a Polytron. Triton Tx-100 was added to a final concentration of 1% and solubilization occurred by rotating for 1h at 4°C . The soluble fraction from a subsequent 15-min centrifugation at 13,000 g (4°C) was used for the experiments. In order to load each lane of the SDS-page with equivalent amounts of total proteins, the protein concentration of each lysate was measured in triplicate by Bradford assay using a BSA standard curve

Western blotting conditions were described elsewhere.¹⁶ Polyclonal $\text{Na}_v1.5$ antibody (ASC-005) was purchased from Alomone (Jerusalem, Israel) and rabbit anti-actin antibody (A 2066) was purchased from SIGMA (Buchs, Switzerland).

Isolation of cardiac myocytes and patch clamp experiments

Ventricular myocytes were isolated as previously described. Whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record I_{Na} . Experiments were performed at room temperature (22-23°C), using a VE-2 (Alembic Instruments) amplifier allowing the recording of large Na^+ currents. Pipettes (tip resistance of 1-2 MΩ) were filled with a solution containing 60 mM CsCl, 70 mM Cesium aspartate, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA and 5 mM Na_2ATP (pH was adjusted to 7.2 with CsOH). Myocytes were bathed with a solution containing 10 mM NaCl, 120 mM NMDG-Cl, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 5 mM CsCl, 10 mM HEPES, and 5 mM Glucose (pH was adjusted to 7.4 with CsOH). Holding potentials were -120 mV and I_{Na} densities (pA/pF) were obtained by dividing the peak I_{Na} by the cell capacitance. Peak currents were measured during a voltage clamp protocol.

ECG recordings and clinical data from SCN5A mutated patients

Patients from Nantes database carrying *SCN5A* loss-of-function mutations were divided in 2 groups based on their age, 6-31 years and 41-61 years. Non-carrier siblings served as controls. Mutated patients were diagnosed with either Brugada syndrome or Lenègre disease. In each age group, *SCN5A*-mutated patients were further divided into 2 subgroups based on QRS interval duration. In the 6-31 year-old patients (mean value of 21 ± 2 years; $n=19$), the median QRS interval duration was 108 ± 10 ms. This value served as a cut off to discriminate patients with a mild (mean QRS = 98 ± 3 ms; 80-108 ms; $n=12$) or a strong phenotype (130 ± 7 ms; 110-158 ms; $n=7$; $p < 0.001$ *versus* mild). In the older patients (41-61 years; 51 ± 1 years; $n=23$), the median QRS interval duration was 112 ± 12 ms and was also used to discriminate the two subgroups: patients with a mild phenotype had a mean QRS interval of 94 ± 2 ms (80-107 ms; $n=11$) and patients with a strong phenotype had a QRS of 122 ± 4 ms (112-160 ms; $n=12$; $p < 0.001$ *versus* mild). All patients have been challenged with a Na^+ channel blocker according to the guidelines edited in the second consensus conference.¹⁷

In a second study, clinical data from Brugada patients carrying *SCN5A* mutations from Nantes and Amsterdam databases were pooled. This mixed database was used to discriminate symptomatic and asymptomatic patients according to the second consensus conference. Baseline QRS interval duration and QRS interval prolongation after a challenge with a Na^+ channel blocker were compared between

the two groups.

Statistical analysis

All data are expressed as means $\pm$ SEM unless otherwise stated. Statistical analysis was performed with Student *t*-test, Kruskal-Wallis test and one- or two-way analysis of variance completed by a Tukey test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Heterogeneity of intraventricular conduction in *Scn5a*^{+/-} mice

Young adult (9-12 week-old) *Scn5a*^{+/-} mice can be separated in two groups based on the duration of their QRS interval. Figure 1A shows representative ECG recordings from a WT and two *Scn5a*^{+/-} mice. The two *Scn5a*^{+/-} mice clearly differ from each other based on their ventricular complex: one exhibits a very prolonged QRS complex whereas the QRS duration in the other mouse is close to normal. Figure 1B displays QRS interval distribution of 84 WT and 136 *Scn5a*^{+/-} young adult mice. Because QRS values in the *Scn5a*^{+/-} group were not normally distributed, a value of 20 ms was used as a cut off to distinguish two subgroups, (i) one with a strong phenotype (QRS $\geq$ 20 ms), and (ii) the other with a mild phenotype (QRS < 20 ms; 12-19 ms). The distribution of each subgroup could then be fitted by a Gaussian curve as shown on the graph. QRS duration in WT littermates ranged from 10 to 18 ms and was normally distributed.

Subpopulations of WT, mild and strong *Scn5a*^{+/-} mice were included in a longitudinal study up to about 80 weeks of age. As shown in Figure 1C, the difference in phenotype was maintained over time: mice with a mild phenotype kept a mild phenotype and mice with a strong phenotype remained with a strong phenotype. As previously observed, there was a progressive increase in QRS interval with age in both WT and *Scn5a*^{+/-} mice, although this increase was slightly larger in *Scn5a*^{+/-} mice. Table 1 provides all the ECG parameters for these mice. Atrial and atrioventricular conduction (as evaluated respectively by the P wave and PR interval

durations) were similar in the two groups of *Scn5a*^{+/-} mice and significantly slower than in WT mice. Therefore, the only ECG parameter that could discriminate the *Scn5a*^{+/-} in two groups was the QRS interval.

Reduced conduction reserve in *Scn5a*^{+/-} mice and *SCN5A*-mutated patients with a strong phenotype

To estimate conduction reserve in *Scn5a*^{+/-} mice, we challenged young and old mice of both phenotypes with the Na⁺ channel blocker ajmaline (20 mg/kg i.p.). Representative examples of ECG traces under baseline condition and 10 minutes after ajmaline injection in old mice (> 53 weeks) are shown in Figure 2A. Ajmaline effects on the QRS interval in the WT and mild *Scn5a*^{+/-} mice were modest. In contrast, ajmaline markedly prolonged the QRS interval in the strong *Scn5a*^{+/-} mouse. In average (Figure 2B, left panel), QRS prolongation in old strong *Scn5a*^{+/-} mice was significantly larger (+12.0±0.8 ms; n=8) than in mild *Scn5a*^{+/-} mice (+9.6±0.7 ms; n=10; p< 0.05). In contrast, in young mice (about 10 weeks old), a similar QRS prolongation was induced in both groups (+10.4±2.0 ms vs +10.4±1.2 ms; n=10 and 11; Figure 2B).

These data perfectly matched with ajmaline test performed in *SCN5A*-mutated patients with either strong or mild phenotype (Figure 2B, right panel). Indeed in patients aged 41 to 61 years, ajmaline-induced QRS prolongation was more pronounced in those with a strong phenotype (+54.6±7 ms; baseline QRS duration > 112 ms) than in those with a mild phenotype (+34± 5 ms; p< 0.05; baseline QRS < 112 ms). In contrast, no statistical significant difference was seen in younger patients aged 6 to 31 years.

Ventricular arrhythmias in strong *Scn5a*^{+/-} mice and wider QRS interval in symptomatic *SCN5A*-mutated patients

A subpopulation of *Scn5a*^{+/-} mice and WT littermates were studied up to 80 weeks of age. With ageing, strong *Scn5a*^{+/-} mice had an increased propensity to develop spontaneous ventricular tachycardia under anesthesia (5/10 *versus* 0/8 mild *Scn5a*^{+/-} mice). Figure 3 shows representative spontaneous ventricular arrhythmias recorded in three different strong *Scn5a*^{+/-} mice. The severity of the arrhythmias ranged from ventricular extrasystoles to salvos of monomorphic ventricular tachycardia.

Table 2 shows the ECG parameters of symptomatic and asymptomatic *SCN5A*-related Brugada patients from Nantes and Amsterdam databases. Symptomatic patients were characterized by a longer QRS interval duration than asymptomatic patients. In addition, symptomatic patients had a more pronounced QRS enlargement after Na⁺ channel blocker injection than asymptomatic patients.

Extensive cardiac fibrosis in the ventricular myocardium of strong *Scn5a*^{+/-} mice.

Ventricular sections stained with Sirius red were evaluated for the presence of fibrosis in old animals (mean age = 83 ± 3 weeks) of each phenotype. As shown in Figure 4A, *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype were characterized by extensive fibrosis located prominently in the left ventricular free wall and intraventricular septum whereas fibrosis in *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype was limited to small areas when present. Semi-quantitative assessment of cardiac fibrosis led to mean scores of 1.88±0.40 in strong *Scn5a*^{+/-} mice (n=8), 0.60±0.4 in mild *Scn5a*^{+/-} mice (n=5) and 0.25±0.25 in WT mice (n=4) mice. No fibrosis was observed in the right ventricular outflow tract region of strong *Scn5a*^{+/-} mice.

As shown in Figure 4A, two transcription factors, *Atf3* and *Egr1*, were overexpressed specifically in *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype.

Differential transcriptional remodeling between mild and strong *Scn5a*^{+/-} mice

High-throughput real-time RT-PCR was used to investigate whether the phenotype heterogeneity of *Scn5a*^{+/-} mice could be explained by a differential remodeling of ion channel ventricular expression. Figure 5 shows the variations of expression of 46 genes encoding ion channel subunits in the ventricles of 10 week-old *Scn5a*^{+/-} mice with a mild (in grey; n=5) and a strong (in black; n=7) phenotype versus WT littermates (n=10). These genes were selected for their cardiac expression in mouse. The first finding is that Na_v1.5 transcript levels were similarly down-regulated by almost 50% in both mild and strong *Scn5a*^{+/-} mice, demonstrating that the phenotype heterogeneity was not due to differential transcription of the normal *Scn5a* allele. The second finding is that ion channel remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice was limited to only 10 genes. Among them, 4 were moderately up-regulated in both groups of *Scn5a*^{+/-} mice. Interestingly, one gene encodes ankyrin B, an anchoring protein that was shown to interfere with Nav1.5.¹⁸ Other genes encode a

regulatory Ca^{2+} channel subunit ($\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$), connexin 45 and a chloride channel (CIC-2) which are all expressed at low levels in mouse ventricular myocardium. The third finding is that genes were differentially regulated between *Scn5a*^{+/-} mice of either phenotype. Five genes were up-regulated only in *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype, including genes encoding the Na^+ channel α -subunit Nav1.3, the T-type Ca^{2+} channel α -subunit $\text{Ca}_v3.2$ and connexin 37. Finally, one gene, which encodes the K^+ channel regulatory protein minK (*Kcne1*), was up-regulated only in mice with a mild phenotype. No gene expression (other than *Scn5a*) was significantly down-regulated. The expression of genes encoding Na/K-ATPases and proteins involved in Ca^{2+} homeostasis was not altered (data not shown).

Reduced Nav1.5 protein expression and I_{Na} density in strong *Scn5a*^{+/-} mice

Western blot experiments performed under blinded conditions indicate that the expression of $\text{Na}_v1.5$ protein in the ventricles of young *Scn5a*^{+/-} mice was reduced by 50% in animals with a strong phenotype (n=10) but by only of 21% in animals with a mild phenotype (n=10; $p < 0.05$ versus strong; Figure 6A). As a consequence, the Na^+ current density was 28% larger in mice with a mild phenotype (59 ± 7 pA/pF; 18 cells from 4 mice) than in mice with a strong phenotype (46 ± 4 pA/pF; 21 cells from 4 mice; Figure 6B), although the difference was not quite significant. For comparison, amplitude of I_{Na} in WT mice was 103 ± 7 pA/pF (16 cells from 4 mice).

Discussion

The main findings of the present study are: (1) that *Scn5a*^{+/-} mice exhibit variable degrees of ventricular conduction defects; (2) that *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype, *i.e.* severe ventricular conduction defects, exhibit more myocardial rearrangements with aging than mice with a mild phenotype; (3) that old mice with a strong phenotype but not with a mild phenotype have a markedly reduced conduction reserve and show spontaneous ventricular arrhythmias; (4) that, similarly, symptomatic Brugada patients carrying *SCN5A* mutations have more pronounced conduction disorders than asymptomatic patients; and (5) that the expressivity of the

conduction deficit in *Scn5a*^{+/-} mice correlates with the ability of the normal allele to produce different amount of functional Na_v1.5 channel proteins.

As observed in SCN5A-related progressive cardiac conduction defects (PCCD) in patients, *Scn5a*^{+/-} mice exhibit a rather large heterogeneity of their ventricular conduction defects which allowed us to separate them into two groups as early as 9-12 weeks of age. Interestingly, the mice with subtle to mild QRS prolongation will remain with a mild phenotype throughout their whole life and the mice with a strong phenotype will never show any improvement of their conduction. To our knowledge, no long-term follow-up of patients with SCN5A-related PCCD is available. However, our results suggest that in young patients the QRS value *per se* rather than a challenge with a Na⁺ channel inhibitor could be a good prognostic marker of the evolution of the disease. Indeed, ajmaline-induced QRS prolongation is similar in both groups of young mice, as in young patients, and becomes discriminative only in older animals, most probably too late for starting a preventive therapy.

Because cardiac conduction relies on both Na⁺ current amplitude, cellular coupling and myocardial architecture, different hypotheses could be proposed to explain *Scn5a*^{+/-} mice phenotypic variability and were tested. We first hypothesized that Na_v1.5 invalidation could lead to altered expression of other ion channel subunits and of connexins that would vary among the mice. Taqman low density array experiments indicate that ion channel remodeling was limited to only 10 genes and that a few ones were indeed differentially regulated depending on the phenotype. However, differential expression of most of these genes was more likely a consequence of the severity of the phenotype rather than a mechanism for the phenotypic variability. For instance, overexpression of the neuronal Na⁺ channel, Na_v1.3, and of the T-type Ca²⁺ channel, Ca_v3.2, most likely result from a positive feedback mechanism for compensating the larger conduction deficit of mice with a strong phenotype. Alternatively overexpression of KvLQT1 K⁺ channel β-subunit minK (*Kcne1*) in *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype might partly explain the shorter QRS interval of these mice since targeted disruption of this gene, which is normally expressed only in the cardiac conduction system,¹⁹ was previously shown to alter conduction velocity.²⁰

From our previous studies, variable myocardial rearrangement was not expected to explain the phenotype heterogeneity since it is already present in young

animals whereas fibrosis occurs only in older mice.' However, the present study demonstrates that mice with the most severe conduction defects at young age will have the most severe myocardial remodeling and fibrosis. This confirms our hypothesis of a direct link between the ventricular conduction defects and fibrosis. Moreover, that occurrence of large areas of fibrosis in mice with a strong phenotype is preceded by a larger overexpression of *Egr1* and *Atf3* in these mice confirms our hypothesis that these two transcription factors make the link between the decreased Na^+ current and myocardial rearrangements.

An alternative hypothesis for explaining the phenotype variability was that *Scn5a*^{+/-} mice had variable decreases in the Na^+ current. As shown in Figure 5, *Scn5a* transcript levels were similar in both groups of *Scn5a*^{+/-} mice suggesting that transcriptional regulation of the WT allele did not differ among the groups. However, our data demonstrate that $\text{Na}_v1.5$ protein levels and Na^+ current amplitudes were higher in *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype than in mice with a strong phenotype. This can explain, at least in part, the variability of the phenotype. The reason for variable expression of $\text{Na}_v1.5$ protein is unknown. Both variable transcriptional (variable splicing) and post-transcriptional regulations of the wild-type *Scn5a* allele can be proposed. At first glance, QRS variability might appear unexpectedly large for an inbred mouse strain. It is widely recognized that environmental variables, such as who carries the experiment and when, can be confounding factors during the characterization of a mouse phenotype.^{21,22} However, these variables are unlikely to explain fully the phenotypic variability of this mouse model. Indeed, all ECG recordings and analysis were carried out by a unique investigator. Moreover, since long-term follow studies have shown that the mice keep their phenotype severity throughout their life, possible interference with the season or time of the day can be excluded. Finally, and perhaps more importantly, histological studies, western blot experiments and patch-clamp recordings were performed under blinded conditions. Clearly much more work is needed for clarifying the mechanisms for this differential $\text{Na}_v1.5$ protein expression. In this context, characterizing the level of genetic polymorphism of the model is obviously a necessity.

In old *Scn5a*^{+/-} mice with severe conduction defects, fibrosis might partly explain the high incidence of spontaneous ventricular tachycardia which was never observed in mice with a mild phenotype and *a fortiori* in WT mice. Indeed, the large areas of fibrosis, associated with the connexin 43 redistribution in fibrosis

surrounding areas that we have previously demonstrated,⁷ most likely contribute to the occurrence of reentries. We never observed any arrhythmic events in younger animals, although *ex vivo* experiments had shown that young adult *Scn5a*^{+/-} mice were more prone than WT mice to develop arrhythmias under programmed electrical stimulation. This suggests that the decrease in Na⁺ current *per se* is not enough to trigger spontaneous arrhythmias. Our experiments with ajmaline show that *Scn5a*^{+/-} mice, as expected, have a reduced conduction reserve as compared to WT animals. More interestingly, the mice with a strong phenotype have a conduction reserve similar to mice with mildly prolonged QRS interval when young but lose this reserve with age. This is typically what is observed in patients with *SCN5A* loss-of-function mutations. Moreover, as observed in our mouse model, symptomatic *SCN5A*-related Brugada patients are characterized by more pronounced ventricular conduction defects than asymptomatic patients. Whether the substrate for arrhythmias in *SCN5A*-related Brugada patients relies essentially on Na_v1.5 dysfunction or involves additional myocardial rearrangements is still unclear. Although structural cardiac abnormalities are not detected using routine noninvasive diagnostic tools, fatty replacement, right ventricular fibrosis, myocyte degeneration and apoptosis have been reported.^{23,24,25} Moreover, a boy with compound heterozygosity for two *SCN5A* mutations exhibited severe degenerative changes in the ventricular conduction system.²⁶ Taken together, studies in patients and in the *Scn5a*^{+/-} mouse model strongly suggest that a primary abnormality in the cardiac Na⁺ channel may, itself, lead to cellular damage. On this basis, arrhythmias may occur when a sufficient degree of myocardial rearrangement has been reached. This would explain why, in the context of an inborn defect, several years (for the humans) or months (for the mice) might elapse before the first arrhythmic event.

As mentioned before, the present study shows that symptomatic *SCN5A*-related Brugada patients are characterized by more pronounced ventricular defects than asymptomatic patients. To our knowledge, this was never reported before. Some of us have recently shown that baseline PQ interval, QRS interval in V1 and S wave in lead II were longer in *SCN5A*-Brugada patients responding positively to flecainide.²⁷ However, these parameters were not predictive of the flecainide test outcome. Unfortunately, we also found that QRS value is not predictive of the occurrence of arrhythmias (data not shown) but it further confirms the importance of conduction defects in the pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome.^{28,29}

In conclusion, our results demonstrate that *Scn5a*^{+/-} mice exhibit variable severities of conduction defects as observed in patients with *SCN5A* loss-of-function mutations. In mice, this variability seems to depend on differential regulation of the wild-type *Na_v1.5* protein. Finally our results further support the involvement of altered ventricular conduction in *SCN5A*-related Brugada syndrome and suggest that severe conduction defects increase highly the risk for arrhythmias.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the ANR "Cardiologie, obésité et diabète" (FC), the ANR "GIS - Institut des Maladies Rares" (JJS & DE) and the Groupement d'Intérêt Scientifique – Institut des Maladies Rares (JJS & FC). The authors wish to thank Béatrice Leray and Agnes Carcouet (Inserm U533) for expert technical assistance.

References

- ¹ Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 1999;23:20-1.
- ² Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Mialet G, Demolombe S, Schott JJ, Baró I, Escande D, Le Marec H. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:643-52.
- ³ Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 1998;392:293-6.
- ⁴ Tan HL, Bezzina CR, Smits JP, Verkerk AO, Wilde AA. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res.* 2003;57:961-73.
- ⁵ Clancy CE, Kass RS. Defective cardiac ion channels: from mutations to clinical syndromes. *J Clin Invest.* 2002;110:1075-7.
- ⁶ Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:350-6.
- ⁷ Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:270-5.
- ⁸ Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baró I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001;104:3081-6.

-
- ⁹ Kaab S, Schulze-Bahr E. Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 2005;67:397-413.
- ¹⁰ 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 U S A*. 2002;99:6210-5.
- ¹¹ Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* 2005;111:1738-46.
- ¹² van Veen TA, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CL, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JM, van Rijen HV. Impaired impulse propagation in *Scn5a*-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 2005;112:1927-35.
- ¹³ Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*. 1998;274:747-51.
- ¹⁴ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- ¹⁵ 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*. 2005;562:223-34.
- ¹⁶ Boixel C, Gavillet B, Rougier JS, Abriel H. Aldosterone increases voltage-gated sodium current in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H2257-66.
- ¹⁷ Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr

- E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 2005;111:659-70.
- ¹⁸ Chauhan VS, Tuvia S, Buhusi M, Bennett V, Grant AO. Abnormal cardiac Na(+) channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ Res*. 2000;86:441-7.
- ¹⁹ Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res*. 1999;84:146-52.
- ²⁰ Balasubramaniam R, Grace AA, Saumarez RC, Vandenberg JI, Huang CL. Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1. *J Physiol*. 2003;552:535-46.
- ²¹ Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome*. 2004;15:768-83.
- ²² Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci*. 2002;5:1101-2.
- ²³ Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 2005;67:367-78.
- ²⁴ Frustaci A, Priori SG, Pileri M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, Russo MA. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation*. 2005;112:3680-7.
- ²⁵ Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de Groot JR, Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, de Bakker JM. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation*.

2005;112:2769-77.

- ²⁶ Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res.* 2003;92:159-68.
- ²⁷ Meregalli PG, Ruijter JM, Hofman N, Bezzina CR, Wilde AA, Tan HL. Diagnostic value of flecainide testing in unmasking SCN5A-related Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17:857-64.
- ²⁸ Tukkier R, Sogaard P, Vleugels J, de Groot IK, Wilde AA, Tan HL. Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome. *Circulation* 2004;109:1272-7.
- ²⁹ Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res.* 2005;67:367-78.

Tables

Table 1. ECG characteristics of wild-type (WT) and heterozygous (*Scn5a*^{+/-}) mild and strong mice.

	n	Age (wks)	RR (ms)	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc
WT	22	9 ± 1	131 ± 4	15 ± 0	35 ± 1	14 ± 0	64 ± 1	57 ± 1
	14	31 ± 0	122 ± 3	16 ± 1	34 ± 1	16 ± 1	60 ± 2	54 ± 1
	20	51 ± 1	124 ± 3	16 ± 1	35 ± 1	16 ± 1	61 ± 1	55 ± 1
	12	81 ± 3	115 ± 1 C	15 ± 1	34 ± 1	16 ± 1 A	58 ± 1 A	54 ± 1
Mild	21	12 ± 1	135 ± 2	18 ± 1 c	38 ± 1 c	16 ± 0 a	67 ± 1	58 ± 1
<i>Scn5a</i>^{+/-}	17	31 ± 0	127 ± 2	18 ± 1	39 ± 1 c	18 ± 0 b, C	61 ± 1 B	54 ± 1 B
	17	49 ± 1	129 ± 3	18 ± 0 b	40 ± 1 c	19 ± 1 c, C	61 ± 1 B	54 ± 1 B
	8	78 ± 5	132 ± 2 b	19 ± 1 a	42 ± 2 c	20 ± 2 c, C	66 ± 2 b	57 ± 1
Strong	17	10 ± 1	143 ± 4 b	18 ± 1 b	39 ± 1 c	22 ± 0 c, ***	69 ± 2 a, *	59 ± 1
<i>Scn5a</i>^{+/-}	16	32 ± 1	128 ± 3 B	19 ± 1 a	38 ± 1 b	23 ± 0 c, ***	63 ± 1 B	56 ± 1
	17	50 ± 2	126 ± 2 C	18 ± 0 b	40 ± 1 c	23 ± 0 c, ***	63 ± 1 B	56 ± 1
	10	80 ± 3	128 ± 2 a, A	19 ± 1 b	43 ± 1 c, B	25 ± 1 c, B, ***	68 ± 2 c	59 ± 1 b

Abbreviations are: n, number of animals per group; RR, RR interval duration; P, P wave duration; PR, PR interval duration; QRS, QRS complex duration; QT, QT interval duration; QTc, corrected QT interval duration. Data are expressed as means ± sem. A, B, C, p < 0.05, p < 0.01 and p < 0.001 respectively *versus* youngest age in each group. a, b, c, p < 0.05, p < 0.01 and p < 0.001 respectively *versus* WT (matching age). *, **, ***, p < 0.05, p < 0.01 and p < 0.001 respectively *versus* Mild (matching age).

Table 2. ECG characteristics of asymptomatic and symptomatic SCN5A-mutated Brugada patients.

	n	Age (yrs)	RR (ms)	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc	ΔQRS (ms)
Asymptomatic	84	41±2	901±18	90±3	191±4	110±2	393±3	417±3	26±2 (75)
Symptomatic	24	46±3	915±31	97±4	200±5 *	118±4 *	401±6	417±7	37±5 * (19)

Abbreviations are: n, number of patients per group; RR, RR interval duration; P, P wave duration; PR, PR interval duration; QRS, QRS complex duration; QT, QT interval duration; QTc, corrected QT interval duration. ΔQRS corresponds to the increase in QRS interval duration after sodium blocker challenge. Within brackets is mentioned the number of patients who were successively challenged. Data are expressed as means ± sem. *, $p < 0.05$ versus asymptomatic patients.

Figure legends

Figure 1. A. Surface ECGs in WT, mild and strong *Scn5a*^{+/-} mice at 10 weeks of age. **B.** Distribution of QRS interval duration in WT (white bars), mild (gray filled bars) and strong (black filled bars) *Scn5a*^{+/-} mice at 10 weeks of age with corresponding Gaussian fit, respectively dotted, gray and black curves. **C.** Effects of age (X-axis) on QRS interval duration (Y-axis) in WT (open symbols), mild (filled triangles) and strong (filled squares) *Scn5a*^{+/-} mice.

Figure 2. Ajmaline challenge in mice and men. A. Surface ECGs in WT, mild and strong *Scn5a*^{+/-} aged > 53 weeks under baseline conditions and 10 minutes after intraperitoneal ajmaline injection (20mg/kg). **B.** QRS interval increase after ajmaline challenge: 1) left panel: in 10 week- and > 53 week-old WT (n=11 and n=10; open bars), mild (n=10 and n=10; gray filled bars) and strong (n=11 and n=10; black filled bars) *Scn5a*^{+/-} mice; 2) right panel: in young (age ranging 6-31 years; mean= 22 years) and older (age ranging 41-61 years; mean age= 50 years) unmutated (n=18 and n=17, open bars), mild (n=10 and n=11; gray filled bars) and strong (n=7 and n=12; black filled bars) SCN5A mutated patients. a, b, c, p< 0.05, p< 0.01 and p< 0.001 respectively *versus* WT or unmutated patients. *, p< 0.05 *versus* mild *Scn5a*^{+/-} mice or mutated SCN5A patients.

Figure 3. Representative examples of spontaneous episodes of ventricular arrhythmias recorded in three different *Scn5a*^{+/-} mice with a strong phenotype under anesthesia. An ECG recorded in a 85 week-old WT mouse is given for comparison.

Figure 4. Expression of fibrosis markers in WT and *Scn5a*^{+/-} ventricles **A.** Semi-quantitative real-time PCR. The graph represents the levels of expression (in arbitrary units) of *Atf3* and *Egr1* genes in WT (open bars), mild (gray filled bars) and strong (black filled bars) *Scn5a*^{+/-} mice as a function of age (10 week-, 32 week- and 60 week-old mice). a, p< 0.05 *versus* WT. *, p< 0.05 *versus* mild *Scn5a*^{+/-} mice. **B.** Fibrosis on histological sections of ventricles in 85 week-old WT, mild and strong *Scn5a*^{+/-} mice. Semi quantitative assessment of fibrosis was made according the

amount of sirius red staining. A score of 0 was attributed to the WT mouse shown, 1 to the mild Scn5a^{+/-} mouse and respectively 2 and 3 to left and right strong Scn5a^{+/-} mice.

Figure 5. Differential expression of Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻, K⁺, HCN channels and connexins in mild and strong Scn5a^{+/-} mice. Bar graphs show the change in relative expression in mild (gray filled bars) and strong (black filled bars) Scn5a^{+/-} mice *versus* WT expressed in percentage (Y-axis) of genes selected for their cardiac expression (X-axis). Data are mean $\pm$ SEM from 5 mild and 7 strong Scn5a^{+/-} mice *versus* 10 WT mice. a, b, c, p< 0.05, p< 0.01 and p< 0.001 respectively *versus* WT. * p<0.05 and *** p<0.001 *versus* mild Scn5a^{+/-} mice.

Figure 6. Reduction of cardiac sodium protein Na_v1.5 and current (*I*_{Na}) in mild and strong Scn5a^{+/-} mice. **A.** Upper panel: representative western blots showing the levels of expression of Na_v1.5 in WT, mild and strong Scn5a^{+/-} mice (mean age= 18 $\pm$ 1 weeks) . Protein loading was controlled by anti-actin immunoblotting. Lower panel: Quantification of Na_v1.5 expression in WT, mild and strong Scn5a^{+/-} was performed on ten Western blots in each group by normalizing the intensities of the Na_v1.5 bands to the actin bands. **B.** Upper panel: Representative *I*_{Na} traces (protocol in *inset*) obtained from ventricular myocytes in 12 week-old WT, mild and strong Scn5a^{+/-} mice. Lower panel: Current densities of *I*_{Na} in myocytes from WT, mild and strong Scn5a^{+/-} mice (4 mice in each group, 4 to 6 cells from each mouse). b, p< 0.01 *versus* WT. *, p<0.05 *versus* mild Scn5a^{+/-} mice.

Figure 1

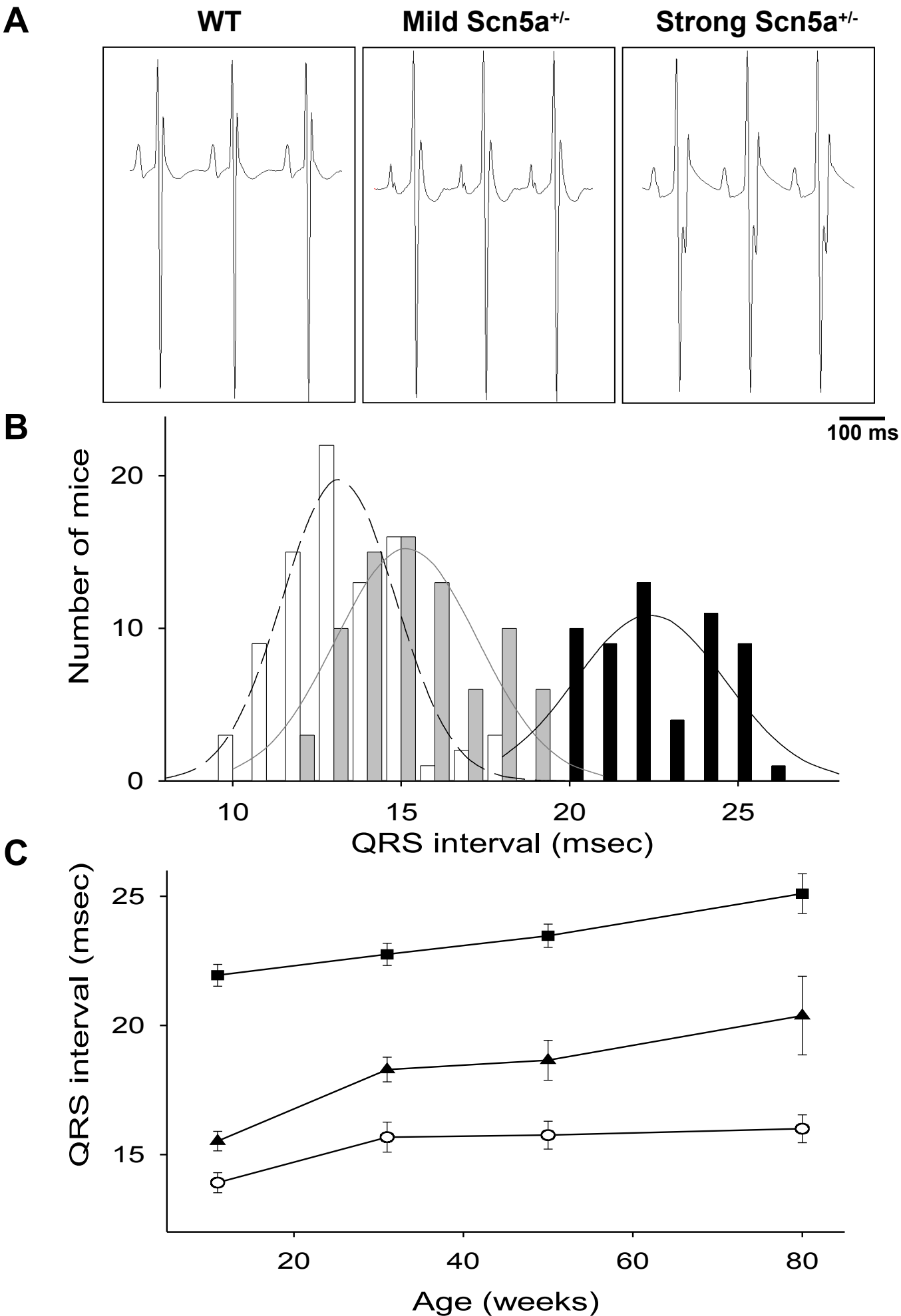


Figure 2

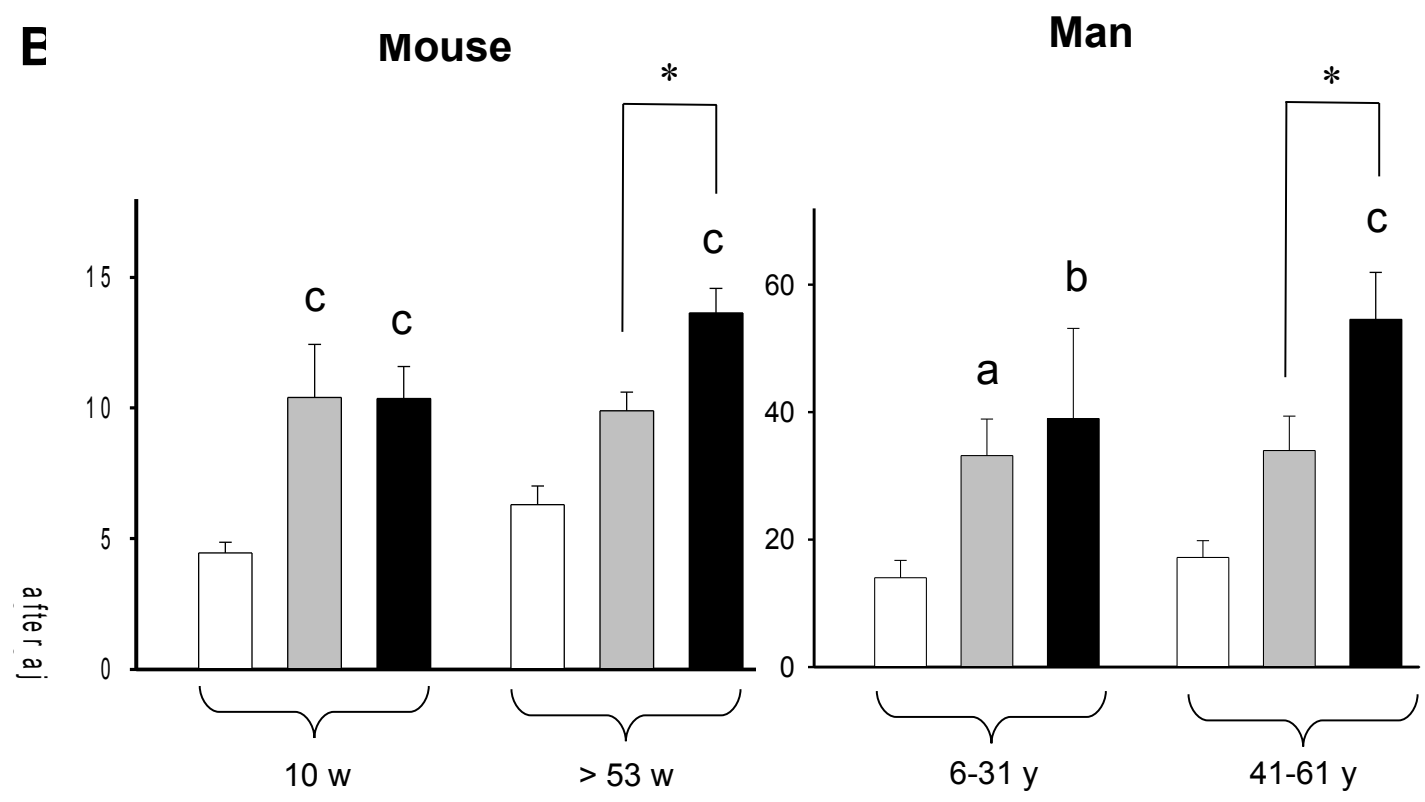
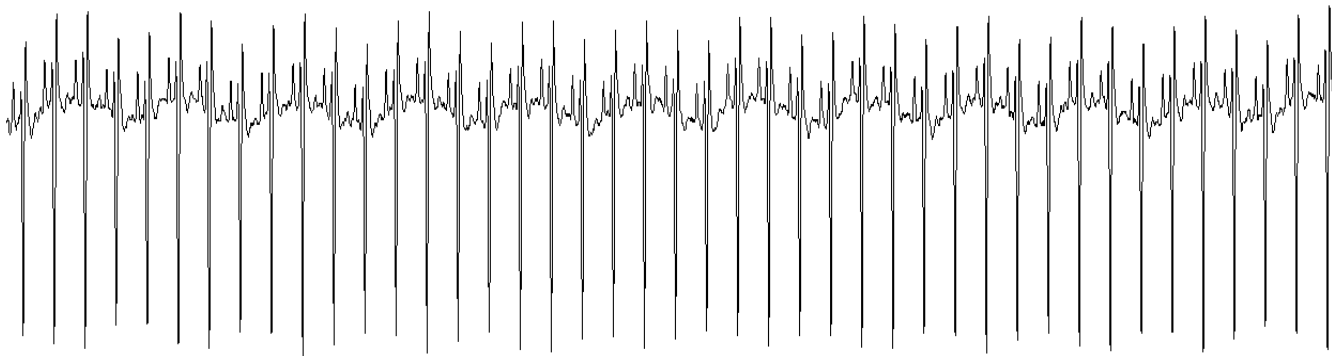
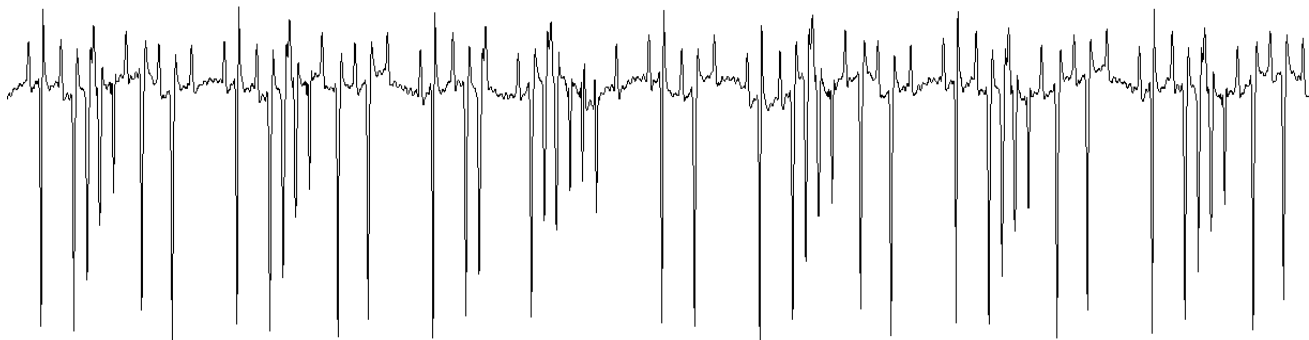


Figure 3

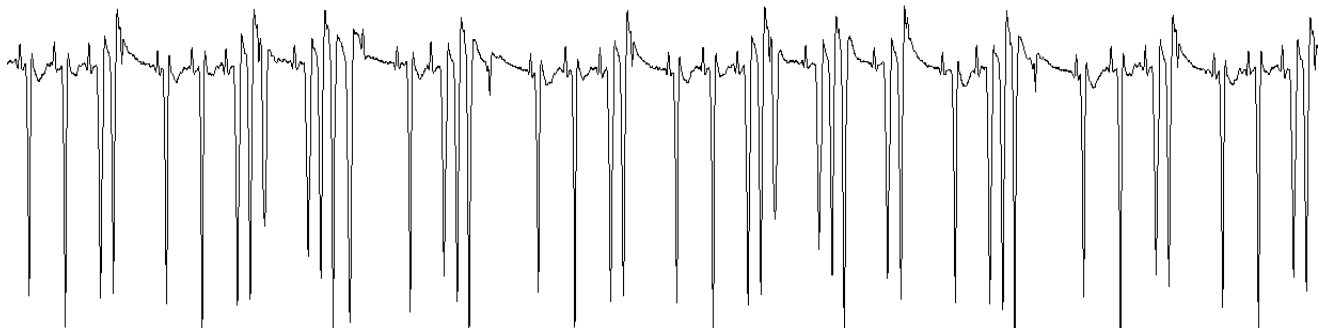
WT



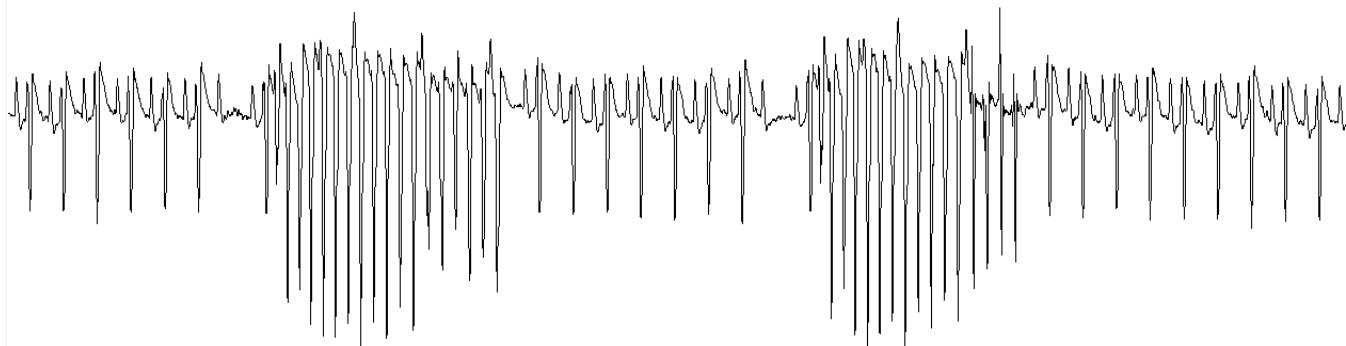
Strong Scn5a^{+/-}



Strong Scn5a^{+/-}



Strong Scn5a^{+/-}



500 ms

Figure 4

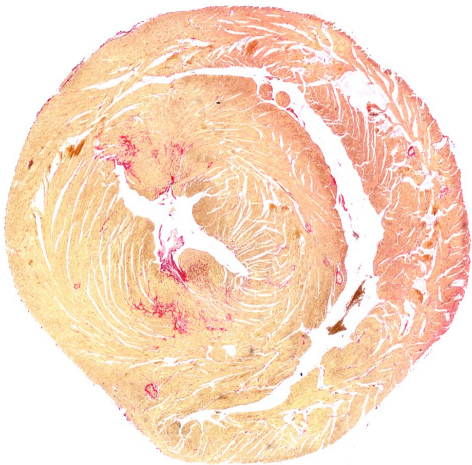
A

WT

Mild
Scn5a^{+/-}

Strong
Scn5a^{+/-}

Strong
Scn5a^{+/-}



B

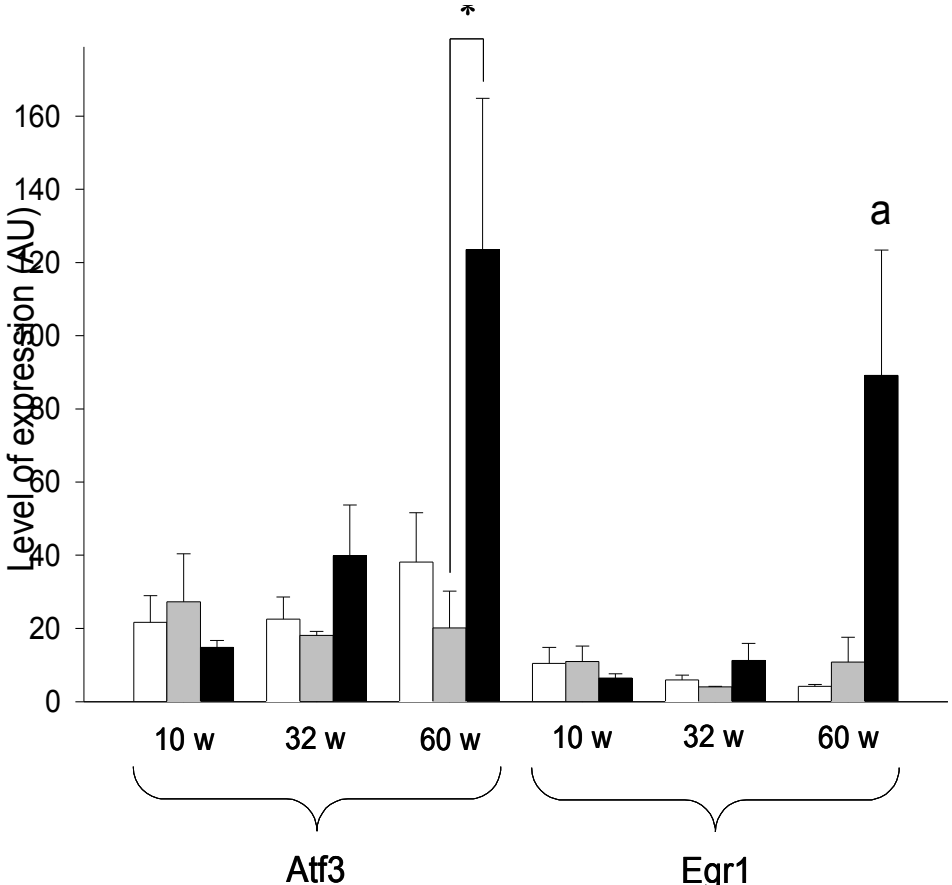


Figure 5

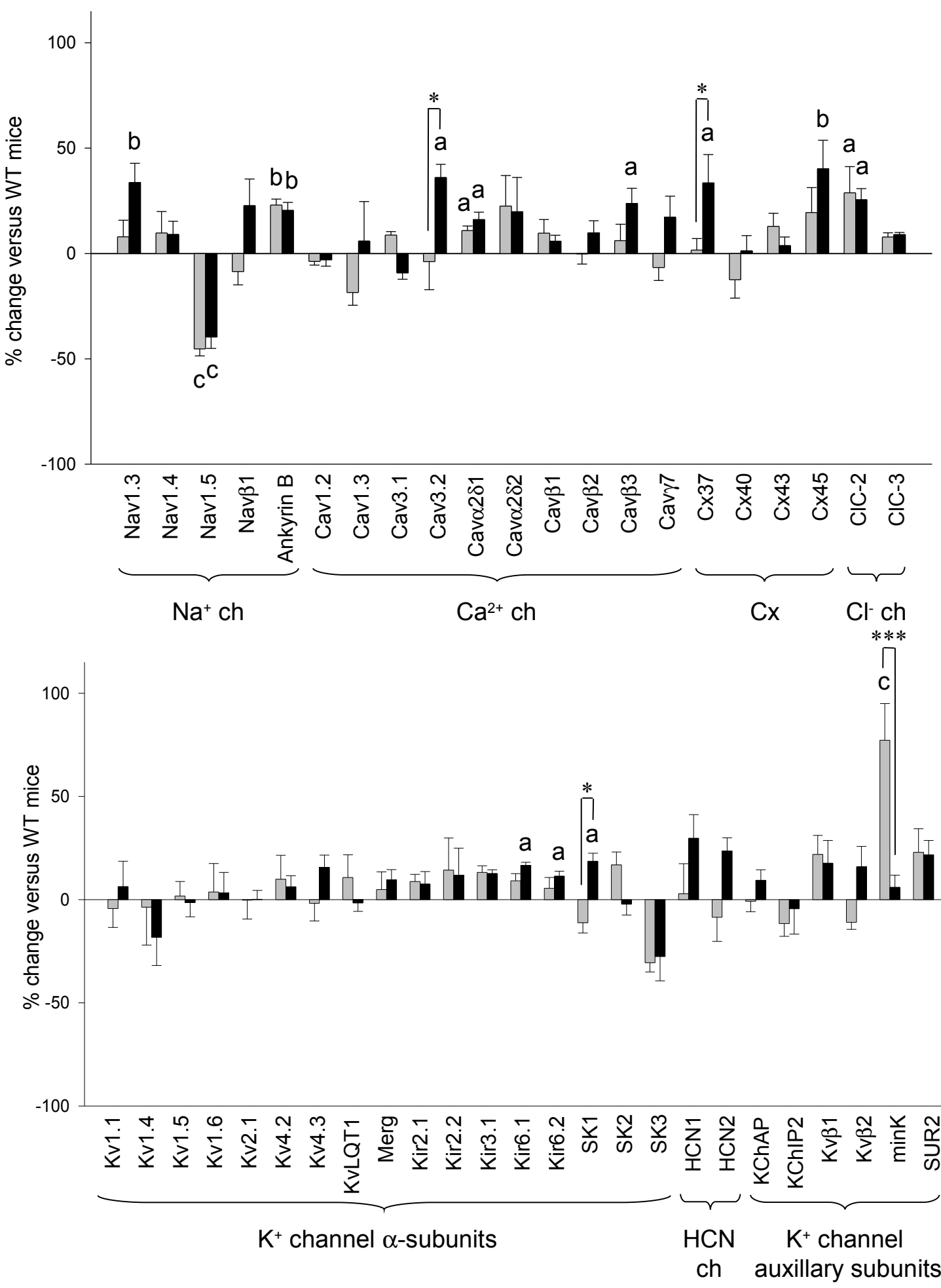
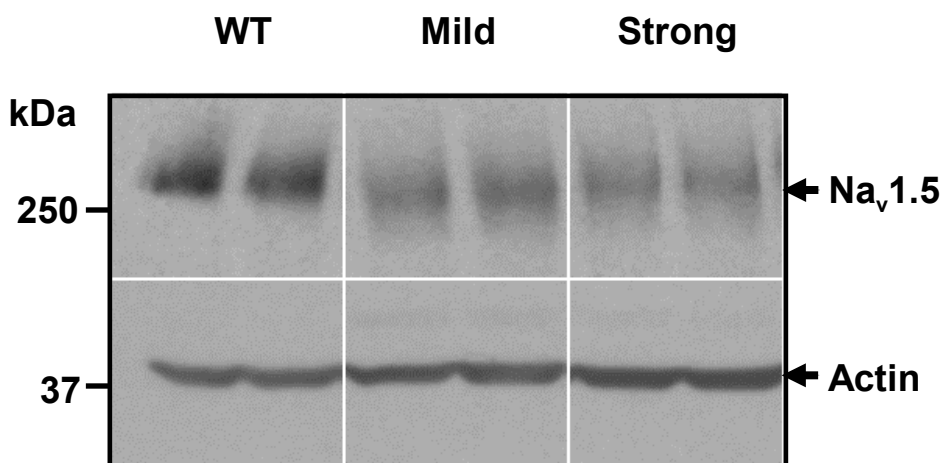
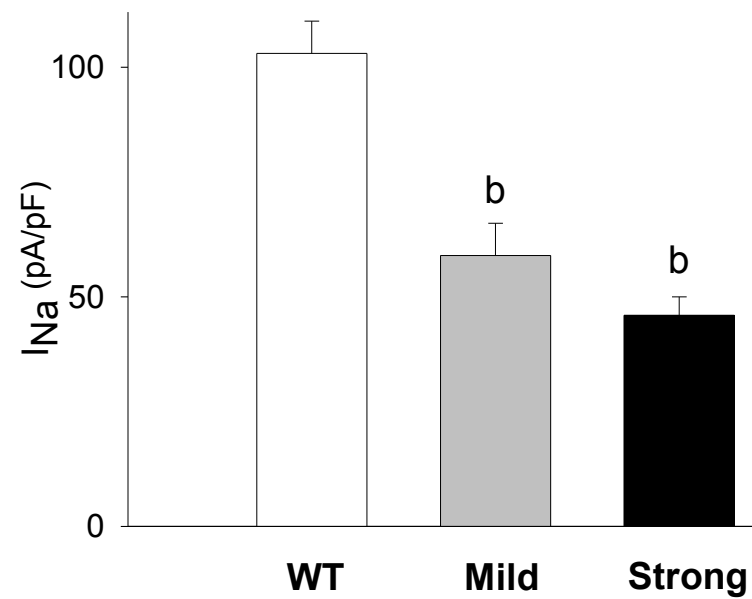
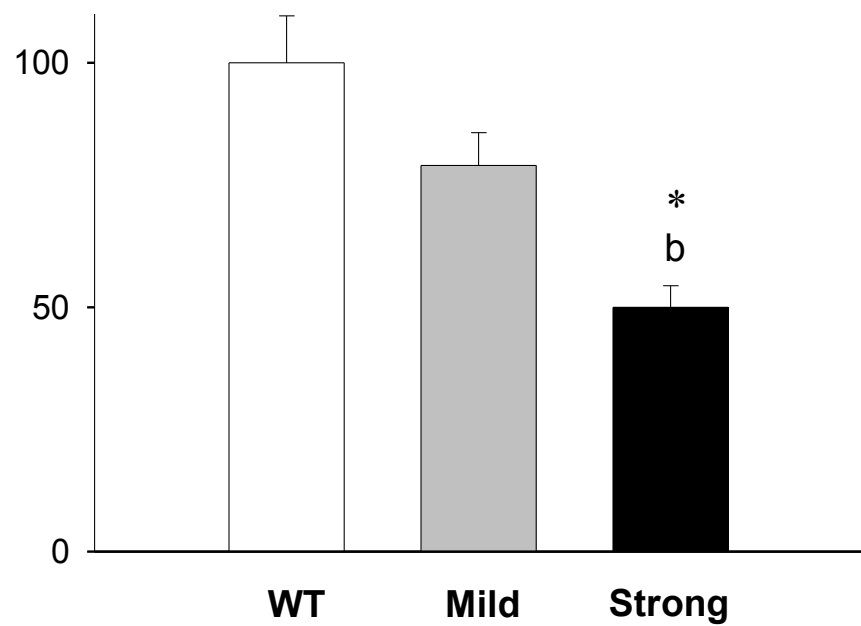
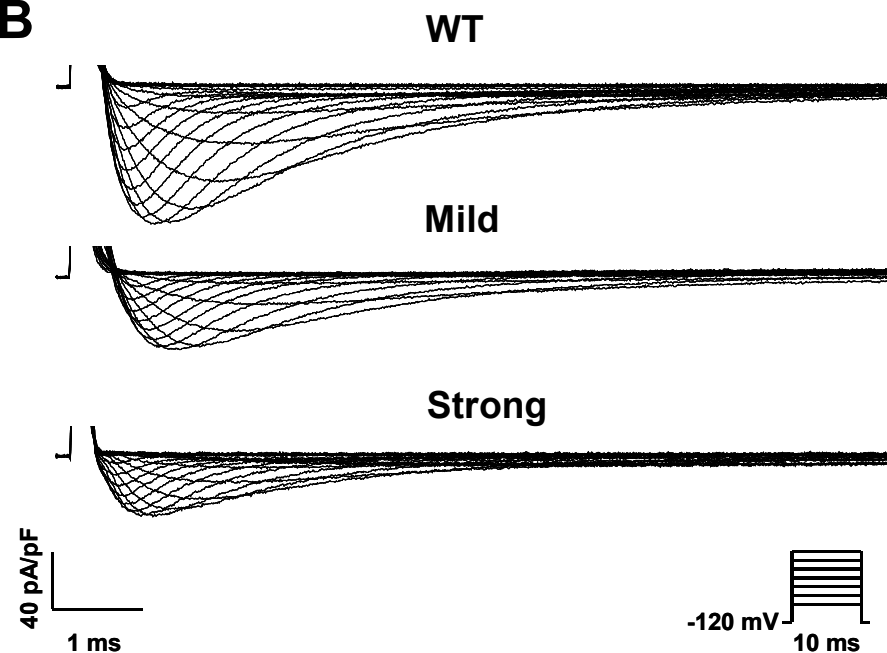


Figure 6

A



B



2. Résultats

L'enregistrement ECG sous anesthésie chez des souris *Scn5a*^{+/-} et sauvages (WT) à un âge compris entre 8 et 13 semaines, nous a permis de distinguer deux populations au sein du groupe de souris *Scn5a*^{+/-} (Figure 1, article 3, page 111). En effet, sur la base de la durée du complexe QRS, nous avons pu distinguer parmi les souris *Scn5a*^{+/-}, un sous-groupe au phénotype sévère (QRS ≥ 20 ms ; QRS moyen = 22.1 ± 0.5 ms) et un sous-groupe au phénotype modéré ($12 \text{ ms} \leq \text{QRS} \leq 19 \text{ ms}$; QRS moyen = 15.8 ± 0.5 ms ; $p < 0.001$ vs WT et *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère). Chez les souris WT du même âge et des mêmes portées, la durée du complexe QRS était comprise entre 10 et 18 ms (QRS moyen = 14 ± 0.3 ms). La forme du complexe QRS est différente entre les deux sous-groupes de souris *Scn5a*^{+/-}, un aspect de bloc de branche est souvent observé chez les souris au phénotype sévère (souris *Scn5a*^{+/-} strong) tandis qu'il est moins fréquent chez les souris au phénotype modéré (souris *Scn5a*^{+/-} mild). Ce résultat est en accord avec la déviation axiale décrite précédemment chez les souris *Scn5a*^{+/-} (van Veen *et al.*, 2005).

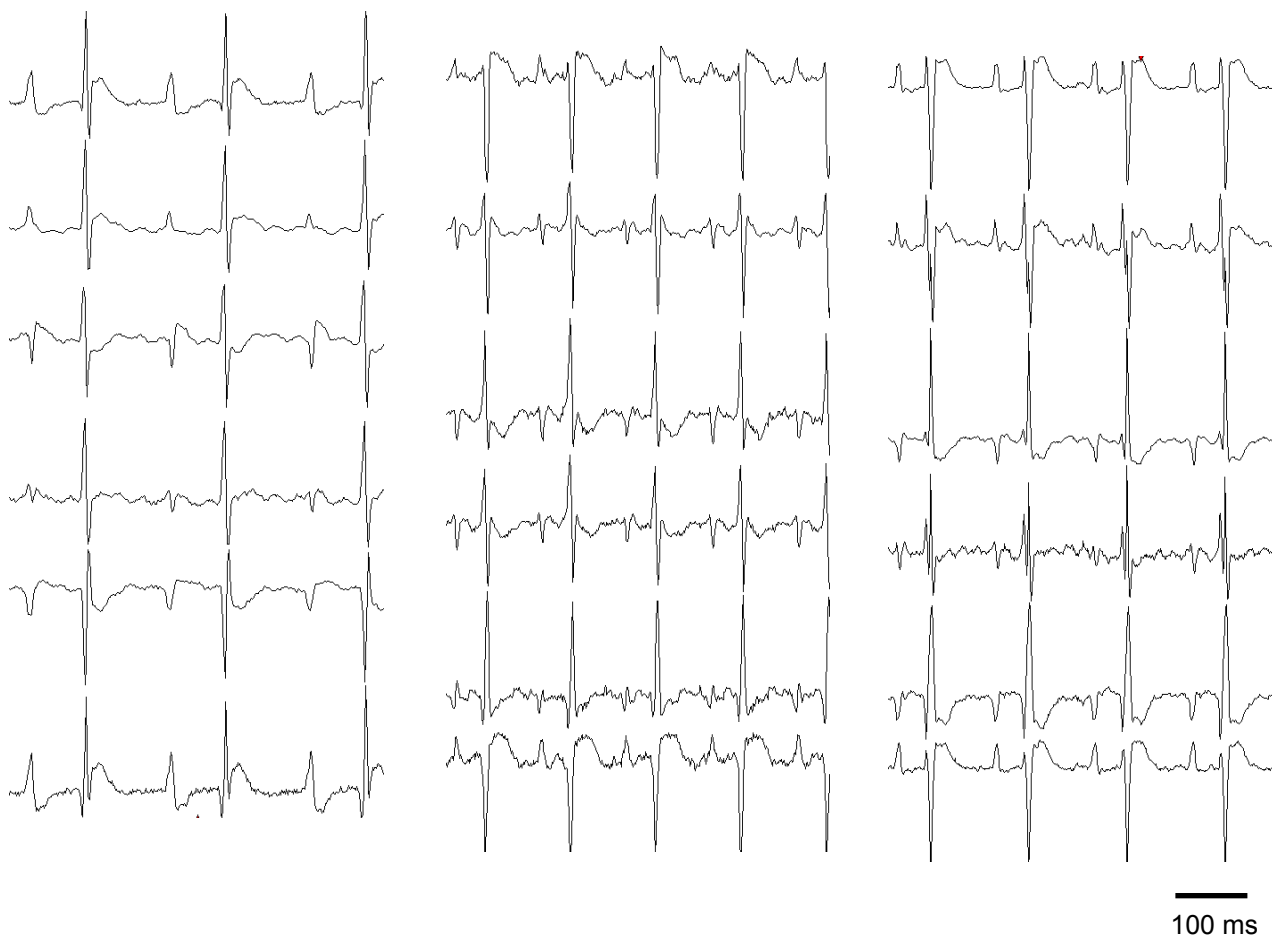


Figure 35 : ECG six dérivations chez des souriceaux âgés de 3 jours. A gauche, une souris WT, au milieu une souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype modéré, à droite une souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère.

Des enregistrements ECG chez des souriceaux âgés de 3 jours ont révélé que cette différence phénotypique était présente très précocement (Figure 35, page 113). Chez les souriceaux, il est intéressant de noter par ailleurs que la repolarisation ventriculaire est moins rapide que chez les souris adultes, il existe un décalage entre la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire. En effet, à cet âge la repolarisation ventriculaire est permise par les courants I_{Ks} et I_{Kr} (Wang *et al.*, 1996).

En conditions de base, la durée de l'intervalle PQ est similaire dans les deux sous-groupes de souris $Scn5a^{+/-}$, mais prolongée par rapport à celle des souris WT (Tableau 1, article 3, page 112).

Afin d'évaluer la réserve de conduction intraventriculaire dans chacun des deux sous-groupes de souris $Scn5a^{+/-}$, nous avons mesuré les effets d'une administration d'un bloqueur des canaux sodiques, l'ajmaline (20mg/kg, IP) sur la durée du complexe QRS (Figure 2, article 3, page 112). A l'âge de 10 semaines, l'allongement de la durée du complexe QRS était similaire dans les deux sous-groupes de souris $Scn5a^{+/-}$. Par contre, chez les animaux de plus d'un an, l'allongement était plus marqué chez les souris $Scn5a^{+/-}$ au phénotype sévère ($+12 \pm 0.8$ ms) par rapport aux souris $Scn5a^{+/-}$ au phénotype modéré ($+9.6 \pm 0.7$ ms, $p < 0.05$). Des résultats similaires ont été obtenus avec un autre inhibiteur sodique (Figure 36), la lidocaïne à la dose de 60 mg/kg (IP).

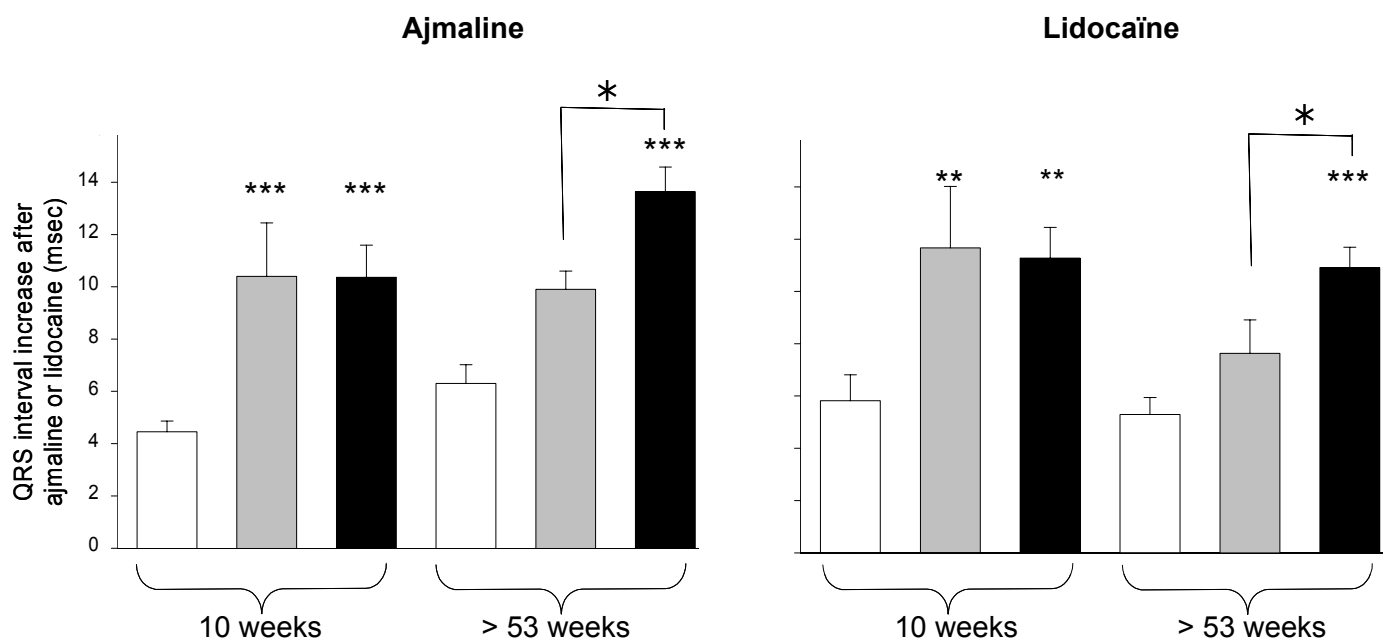


Figure 36 : Effet d'une administration d'ajmaline ou de lidocaïne sur la durée du complexe QRS chez des souris WT ou $Scn5a^{+/-}$ âgées de 10 semaines ou de plus de 53 semaines. En blanc sont représentées les souris WT, en gris les souris $Scn5a^{+/-}$ au phénotype modéré et en noir les souris $Scn5a^{+/-}$ au phénotype sévère. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ versus WT.

L'effet d'un inhibiteur sodique sur la conduction intraventriculaire chez les souris *Scn5a*^{+/-} est en accord avec les effets observés lors d'un test à l'ajmaline chez des patients mutés *SCN5A* (Figure 2B, article 3, page 112). Nous avons analysé rétrospectivement les données de patients porteurs de mutations perte de fonction du gène *SCN5A*. Nous avons distingué les patients âgés de 6 à 31 ans de ceux âgés de 41 à 61 ans. Chez les patients jeunes, nous avons pu distinguer des patients ayant un phénotype modéré (QRS ≤108 ms, QRS moyen= 98.3±2.7 ms) et des patients ayant un phénotype sévère (QRS ≥110 ms ; QRS moyen= 129.9±6.6 ms ; $p<0.05$). Chez ces patients jeunes, les effets d'une administration d'ajmaline sur la durée du complexe QRS était similaire dans les deux groupes. Chez les patients plus âgés, les patients au phénotype modéré avaient une durée du complexe QRS comprise entre 80 et 107 ms (QRS moyen= 94.4±2.4 ms), tandis qu'elle était supérieure à 112 ms chez les patients plus sévèrement atteints (QRS moyen= 122.4 ±3.7 ms ; $p<0.001$). Dans cette classe d'âge, l'effet de l'ajmaline était plus prononcé chez les patients au phénotype sévère (+54.6±7 ms) par rapport à ceux au phénotype modéré (+34.5±5 ms, $p<0.05$).

Afin de suivre dans le temps l'évolution de l'hétérogénéité phénotypique observée chez les souris *Scn5a*^{+/-}, nous avons réalisé un suivi électrocardiographique jusqu'à l'âge de 80 semaines des trois groupes d'animaux. Cette étude nous a permis de montrer que les différences phénotypiques se maintenaient jusqu'à cet âge avancé (Figure1, article 3, page 112). Nous avons par ailleurs pu identifier la survenue de troubles du rythme ventriculaire spontanés chez les souris *Scn5a*^{+/-} strong, tandis que chez les souris WT et les souris *Scn5a*^{+/-} mild aucune épisode arythmique n'a été mis en évidence (Figure 3, article 3, page 112). Comme les patients mutés *SCN5A* peuvent aussi avoir un phénotype du type Brugada avec des troubles du rythme ventriculaire, nous avons analysé rétrospectivement les données ECG d'une cohorte de patients mutés *SCN5A* au phénotype Brugada. Parmi ces patients, nous avons distingué ceux qui étaient symptomatiques selon la définition de la 2^{ème} conférence de consensus (Antzelevitch *et al.*, 2005) des asymptomatiques. De manière intéressante, nous avons constaté que chez les patients symptomatiques la durée du complexe QRS était plus longue (118±4 ms) par rapport à celle des patients asymptomatiques (110±2 ms, $p<0.05$). Par ailleurs, l'allongement de la durée du complexe QRS lors de l'administration d'un inhibiteur des canaux sodiques (Tableau 2, article 3, page 112) était plus prononcé chez les patients symptomatiques (+37±5 ms) que chez les patients asymptomatiques (+26±2 ms, $p<0.05$). Les patients sujets aux troubles du rythme avaient une réserve de conduction ventriculaire plus fortement réduite que les patients asymptomatiques.

Un intérêt des modèles murins réside dans la possibilité qu'ils offrent de pouvoir explorer les déterminants moléculaires d'un phénotype observé. Nous avons donc recherché à l'échelle transcriptionnelle, protéique ou du courant sodique cardiaque des différences qui pourraient nous permettre d'expliquer les différences de phénotype observées chez les souris *Scn5a*^{+/-} et par la même, celles existant chez les patients mutés *SCN5A*. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression transcriptionnelle de canaux ioniques et de protéines de l'homéostasie calcique dans le tissu ventriculaire de souris WT et *Scn5a*^{+/-} des deux phénotypes (Figure 5, article 3, page 112). Seuls quatre gènes avaient une expression différentielle entre les deux sous-groupes de souris *Scn5a*^{+/-}. La sous-unité α des canaux calciques de type T $\text{Ca}_v3.2$, la Cx37 et un canal potassique activé par le calcium (SK1) étaient surexprimés chez les souris au phénotype sévère, tandis que l'expression de la sous-unité régulatrice minK était fortement augmentée chez les souris au phénotype modéré. L'expression de quatre autres gènes était augmentée de manière similaire dans les 2 sous-groupes de souris *Scn5a*^{+/-}. Ces gènes codaient pour l'ankyrine B, la sous-unité régulatrice $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ des canaux calciques, un canal chlore et le canal sodique $\text{Na}_v1.5$. La diminution d'expression du gène *Scn5a* était de 50 % par rapport aux souris WT pour les deux sous-groupes de souris *Scn5a*^{+/-}. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression protéique du canal sodique, $\text{Na}_v1.5$, codé par le gène *Scn5a*. De manière intéressante, la quantité de protéines $\text{Na}_v1.5$ était diminuée de 50% chez les souris au phénotype sévère par rapport aux souris WT, tandis que cette diminution était de seulement 21% chez les souris au phénotype modéré (Figure 6, article 3, page 112). Enfin, la densité du courant sodique I_{Na} mesuré à partir de cardiomyocytes ventriculaires isolés de souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère était plus faible (46 ± 4 pA/pF) que celle mesurée chez les souris au phénotype modéré (59 ± 7 pA/pF). Ces densités étaient inférieures à celle mesurée à partir des cardiomyocytes de souris WT (103 pA/pF).

Enfin, le suivi longitudinal des animaux nous a permis d'étudier le remodelage tissulaire à l'âge de 80 semaines. A l'analyse histologique des cœurs, nous avons constaté la présence d'une fibrose massive chez les souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère par rapport aux souris WT et *Scn5a*^{+/-} au phénotype modéré (Figure 4A, article 3, page 112). Cette fibrose était en accord avec l'augmentation de l'expression des deux facteurs de transcription, *Egr1* (early growth response 1) et *Atf3* (activating transcription factor 3) chez les souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère à partir de l'âge de 60 semaines (Figure 4B, article 3, page 112).

3. Discussion - Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer qu'il existait chez les souris *Scn5a*^{+/-} une hétérogénéité phénotypique similaire à celle observée chez les patients porteurs de mutations perte de fonction du gène *SCN5A*. Cette hétérogénéité repose sur une altération modérée ou sévère de la conduction intraventriculaire qui se traduit par des durées du complexe QRS plus allongées chez les souris et patients au phénotype sévère.

En vieillissant, cette différence phénotypique est conservée chez les souris *Scn5a*^{+/-}. Par ailleurs, chez les animaux de plus de un an, la réserve de conduction est plus fortement réduite chez les souris hétérozygotes au phénotype sévère. De manière similaire, les patients de plus de 40 ans au phénotype sévère voient la durée de leur complexe QRS s'allonger plus fortement que celle des patients mutés *SCN5A* au phénotype modéré, lors d'un challenge avec un inhibiteur des canaux sodiques. L'augmentation de l'expression transcriptionnelle des facteurs de transcription *Atf3* et *Egr1* à l'âge de 60 semaines chez les souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère concorde avec le développement d'une fibrose réactionnelle abondante et irrégulière dans le ventricule de ces souris. La présence d'une fibrose ventriculaire majeure pourrait expliquer la plus forte réduction de la réserve de conduction dans ce sous-groupe de souris *Scn5a*^{+/-}. Les facteurs de transcription *Atf3* et *Egr1* sont connus pour augmenter la fibrose myocardique en conditions physiopathologiques (Okamoto *et al.*, 2001 ; Saadane *et al.*, 2000).

La fibrose massive existant chez les souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère est à mettre en relation avec les troubles du rythme ventriculaire observés chez ces animaux. La fibrose mise en évidence à l'âge de 80 semaines touchait plus spécifiquement le septum interventriculaire et le ventricule gauche. De manière intéressante, l'analyse histologique de biopsies ventriculaires prélevées chez des patients mutés *SCN5A* atteints du syndrome de Brugada a révélé la présence d'infiltrats fibro-graisseux préférentiellement à droite (Frustaci *et al.*, 2005). De même, chez un patient porteur d'une mutation du gène *SCN5A* et souffrant de fibrillation ventriculaire, une fibrose plus marquée dans la chambre de chasse du ventricule droit a été rapportée (Coronel *et al.*, 2005). L'existence de connexions directes entre le faisceau de His et la base du septum chez la souris, conduisant à une activation baso-apicale du septum chez la souris pourrait en partie expliquer ces différences de localisation de la fibrose myocardique entre les patients et notre modèle murin (van Rijen *et al.*, 2001).

En conclusion, la corrélation parfaite entre les effets de l'ajmaline chez les souris *Scn5a*^{+/-} et ceux observés chez les patients mutés *SCN5A* pourrait permettre aux cliniciens de considérer que les patients ayant un allongement prononcé du complexe QRS en conditions de base sont plus à risque de développer des troubles du rythme ventriculaire.

La différence phénotypique observée chez les souris *Scn5a*^{+/-} survient très précocement, car elle est observable dès l'âge de 3 jours. Les modifications d'expression transcriptionnelle observées à l'âge de 10 semaines entre les souris au phénotype sévère et celles au phénotype modéré ne permettent pas d'expliquer ces différences phénotypiques. Le faible remodelage observé semble être réactionnel plutôt qu'à l'origine de l'hétérogénéité du phénotype. La sur-expression des gènes codant pour les protéines *Ca_v3.2*, *Cx37* chez les souris au phénotype sévère pourrait être interprétée comme un mécanisme compensateur. Cependant, il est important de noter que l'expression du gène codant la sous-unité *Ca_v3.2*, dans le cœur est faible comparée à celle de son homologue de la même famille, *Ca_v3.1* (Marionneau *et al.*, 2005), ce qui suggère sa faible implication dans un mécanisme de compensation. La *Cx37* est une connexine des cellules endothéliales, et sa surexpression chez les souris au phénotype sévère est peut être à rapprocher de la fibrose perivasculaire qui a été observé chez les souris *Scn5a*^{+/-} âgées de 14 à 16 semaines (Royer *et al.*, 2005). La sur-expression ventriculaire de l'ankyrine B chez toutes les souris transgéniques pourrait jouer un rôle compensateur majeur en régulant l'expression fonctionnelle du courant *I_{Na}*. En effet, une étude chez les souris ankyrine B^{-/-} a montré de nombreuses anomalies du courant *I_{Na}* telles qu'une diminution de la densité du courant et des modifications de ses propriétés d'activation, d'inactivation et de réactivation (Chauhan *et al.*, 2000). De la même façon, la sur-expression du gène codant pour la sous-unité régulatrice *Cavα2δ1* pourrait réguler l'expression fonctionnelle du courant *I_{Ca,L}*, et participer ainsi à un phénomène d'adaptation compensateur. La seule compensation potentielle dans le ventricule des souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype modéré correspond à la sur-expression du gène codant pour la sous-unité *mink*. Cette protéine est fortement exprimée dans le système de conduction proximal et les fibres de Purkinje chez la souris (Kupersmidt *et al.*, 1999 ; données non publiées du laboratoire). Il serait donc intéressant d'analyser plus précisément cette modification d'expression dans les fibres de Purkinje des souris *Scn5a*^{+/-}. Pour cela, il pourrait être envisagé de croiser les souris *Scn5a*^{+/-} avec les souris surexprimant une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur de la *Cx40* (souris *Cx40*^{EGFP/+}) qui nous permettrait de visualiser les fibres de Purkinje (Miquerol *et al.*, 2004).

Des protéines partenaires du canal *Na_v1.5* sont connues et n'appartiennent pas à la famille des canaux ioniques (Abriel & Kass, 2005 ; Meadows & Isom, 2005). Il paraît donc indispensable d'élargir notre analyse transcriptionnelle à l'expression d'un bien plus grand nombre de gènes par l'utilisation de puces à ADN pangénomiques, afin d'évaluer la possible contribution d'autres familles de gènes dans la mise en place de l'hétérogénéité phénotypique observée chez les souris *Scn5a*^{+/-}.

L'expression transcriptionnelle du gène *Scn5a* est diminuée de 50% dans les deux sous-groupes de souris *Scn5a*^{+/-}. Cependant, l'expression de la protéine Na_v1.5 est diminuée de 50%, seulement chez les souris au phénotype sévère. Dans l'autre sous-groupe, cette diminution est de 21%, ce qui leur permet d'avoir une moindre diminution du courant I_{Na} enregistré à partir de leurs cardiomyocytes. Les différences de densité de courant sodique pourraient permettre d'expliquer l'hétérogénéité phénotypique observées chez ces souris ; la moindre diminution du courant permettrait de limiter les défauts de conduction observés chez les souris au phénotype modéré. Ces résultats laissent supposer l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la sous-unité Na_v1.5, différente entre les souris *Scn5a*^{+/-} au phénotype sévère et celles au phénotype modéré. Des mécanismes de compensation de la perte d'un allèle seraient activés chez les souris au phénotype modéré mais pas ou de manière inopérante chez les souris au phénotype sévère (Rosati & McKinnon, 2004). A partir d'une même quantité d'ARN, la synthèse de la protéine Na_v1.5 pourrait être augmentée ou sa dégradation diminuée chez les souris au phénotype modéré. Ce canal fait partie d'un complexe macromoléculaire où il interagit avec de nombreuses autres protéines qui modulent son expression et son activité (Meadows & Isom, 2005). De la même manière, les sous-unités Na_v1.5 sont indispensables à l'équilibre de ces complexes. Chez les souris au phénotype modéré, certaines de ces protéines pourraient compenser l'haploinsuffisance de *Scn5a* et limiter les conséquences fonctionnelles de cette invalidation. L'identification de l'ensemble des partenaires de la sous-unité Na_v1.5 et des mécanismes de régulation de l'expression de ce canal ionique constituent des étapes préalables indispensables à la compréhension des mécanismes de compensation activés chez les souris *Scn5a*^{+/-}, et par la même possiblement chez les patients mutés *SCN5A*. La technique des puces à ADN évoquée précédemment ou celle des puces à protéines devrait nous permettre d'identifier chez ces souris des déterminants moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique, autres que le gène *Scn5a* ou la protéine Na_v1.5.

Pour finir, il nous paraît important de rappeler que les différences de phénotype observées chez les souris *Scn5a*^{+/-} surviennent dans un modèle murin considéré comme ayant un fond génétique stable. Ces animaux sont sensés avoir un patrimoine génétique quasi identique contrairement aux souris non consanguines. A l'heure actuelle, des techniques de génétique permettent d'étudier l'intégralité du génome d'individus afin d'évaluer leur niveau d'homologie, comme par exemple les puces à SNP (Single nucleotide polymorphisms). L'utilisation de cette technique pourrait nous permettre d'évaluer l'homologie des génomes de nos souris *Scn5a*^{+/-} et de détecter des polymorphismes sur certains gènes d'intérêt qui pourraient permettre d'expliquer l'hétérogénéité phénotypique

observée chez ces animaux. Certains des gènes mis en évidence par cette technique pourraient être semblables à ceux détectés par la technique des puces pangénomiques.

III. Modification de l'expression transcriptionnelle des canaux ioniques dans le nœud sinusal chez la souris lors d'un ralentissement chronique de la fréquence cardiaque avec l'ivabradine.

A. Introduction

Ces dernières années, le développement des techniques d'analyse transcriptionnelle à haut débit a permis l'étude des effets moléculaires d'un traitement pharmacologique (Shinagawa *et al.*, 2003 ; Remme, 2003 ; Swynghedauw, 2002). Dans ce contexte, il a été montré au sein du laboratoire qu'un traitement chronique avec l'amiodarone entraîne un remodelage complexe de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques dans le tissu ventriculaire chez la souris (Le Bouter *et al.*, 2004). Le remodelage ionique observé avec un traitement chronique à l'amiodarone ne peut être entièrement expliqué par les modifications d'expression qu'entraîne le syndrome hypothyroïdien induit par cet antiarythmique, comme en atteste un modèle murin d'hypothyroïdie (Le Bouter *et al.*, 2003). Comme l'administration chronique d'amiodarone induit aussi une bradycardie modérée, nous avons souhaité savoir si le ralentissement de la fréquence cardiaque peut en lui-même modifier l'expression des canaux ioniques dans le cœur.

A ce jour, le seul moyen pour réduire durablement et de manière modérée la fréquence cardiaque chez la souris passe par une administration pharmacologique. L'ivabradine (S 16257) est un inhibiteur sélectif du courant *pacemaker* I_f appartenant à la classe des agents bradycardisants spécifiques (Thollon *et al.*, 1994 ; Bois *et al.*, 1996 ; Bucchi *et al.*, 2002). L'ivabradine induit une diminution dose-dépendante de la fréquence cardiaque chez l'homme et l'animal sans affecter la conduction auriculo-ventriculaire ou intra-ventriculaire et la contractilité ventriculaire (Gardiner *et al.*, 1995 ; Simon *et al.*, 1995 ; Monnet *et al.*, 2001 ; Ragueneau *et al.*, 1998). Les effets anti-angineux et anti-ischémiques d'un traitement bradycardisant par l'ivabradine ont fait leurs preuves dans de nombreuses

études à la fois chez l'homme et l'animal (Borer *et al.*, 2003 ; Mulder *et al.*, 2004). De la même façon, une étude a montré que l'effet bénéfique d'un traitement β -bloquant dans un modèle pathologique chez le chien est en partie lié à la bradycardie qu'il induit (Nagatsu *et al.*, 2000). Alors que les effets d'une bradycardie sévère ($\approx$ -50%), tels que ceux observés dans des modèles de bloc auriculo-ventriculaire, sur le remodelage ionique et électrique ont largement été décrits, l'effet d'une bradycardie modérée (-10 à -15%) n'a jamais été évalué. Il faut noter cependant que ces derniers modèles expérimentaux sont associés à une hypertrophie sévère, excluant une corrélation directe entre la bradycardie et le remodelage ventriculaire observé. La seule évidence suggérant l'implication directe d'une bradycardie sévère dans l'induction d'un remodelage ionique provient d'une étude dans un modèle de bloc auriculo-ventriculaire chez le chien montrant que le remodelage électrique précède le développement de l'hypertrophie ventriculaire (Schoenmakers *et al.*, 2003).

L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer les modifications d'expression des canaux ioniques dans le cœur chez la souris lors d'un traitement bradycardisant avec l'ivabradine. Ce travail devait permettre d'évaluer la part de la bradycardie dans le remodelage ionique ventriculaire induit par un traitement par l'amiodarone (Le Bouter *et al.*, 2004). Cette étude a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Physiol Genomics* (Leoni *et al.*, article 4, page 122).

Article 4

Chronic heart rate reduction remodels ion channel transcripts in the mouse sinoatrial node but not in the ventricle

Anne-Laure Leoni^{#1}, Céline Marionneau^{#1}, Sophie Demolombe¹, Sabrina Le Bouter¹, Matteo E. Mangoni², Denis Escande¹ and Flavien Charpentier¹

¹ Institut du thorax, Inserm U533, Faculté de Médecine, Nantes, France.

² CNRS UMR5203, Inserm U661, Institut de Génomique Fonctionnelle, Universités de Montpellier I & II, Montpellier, France.

: These authors contributed equally to this study

Physiol Genomics. 2005; 24 : 4-12.

B.

Chronic heart rate reduction remodels ion channel transcripts in the mouse sinoatrial node but not in the ventricle

Anne-Laure Leoni, Céline Marionneau, Sophie Demolombe, Sabrina Le Bouter, Matteo E. Mangoni, Denis Escande and Flavien Charpentier

Physiol Genomics 24:4-12, 2005. First published Oct 11, 2005;
doi:10.1152/physiolgenomics.00161.2005

You might find this additional information useful...

This article cites 48 articles, 19 of which you can access free at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/24/1/4#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/24/1/4>

Additional material and information about *Physiological Genomics* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/pg>

This information is current as of July 18, 2006 .

Chronic heart rate reduction remodels ion channel transcripts in the mouse sinoatrial node but not in the ventricle

Anne-Laure Leoni,^{1,*} Céline Marionneau,^{1,*} Sophie Demolombe,¹ Sabrina Le Bouter,¹ Matteo E. Mangoni,² Denis Escande,¹ and Flavien Charpentier¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U533, l'Institut du Thorax, Nantes; and ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR)5203, INSERM, U661, Institut de Génomique Fonctionnelle, Universités de Montpellier I & II, Montpellier, France

Submitted 6 July 2005; accepted in final form 7 October 2005

Leoni, Anne-Laure, Céline Marionneau, Sophie Demolombe, Sabrina Le Bouter, Matteo E. Mangoni, Denis Escande, and Flavien Charpentier. Chronic heart rate reduction remodels ion channel transcripts in the mouse sinoatrial node but not in the ventricle. *Physiol Genomics* 24: 4–12, 2005. First published October 11, 2005; doi:10.1152/physiolgenomics.00161.2005.—We investigated the effects of chronic and moderate heart rate (HR) reduction on ion channel expression in the mouse sinoatrial node (SAN) and ventricle. Ten-week-old male C57BL/6 mice were treated twice daily with either vehicle or ivabradine at 5 mg/kg given orally during 3 wk. The effects of HR reduction on cardiac electrical activity were investigated in anesthetized mice with serial ECGs and in freely moving mice with telemetric recordings. With the use of high-throughput real-time RT-PCR, the expression of 68 ion channel subunits was evaluated in the SAN and ventricle at the end of the treatment period. In conscious mice, ivabradine induced a mean 16% HR reduction over a 24-h period that was sustained over the 3-wk administration. Other ECG parameters were not modified. Two-way hierarchical clustering analysis of gene expression revealed a separation of ventricles from SANs but no discrimination between treated and untreated ventricles, indicating that HR reduction per se induced limited remodeling in this tissue. In contrast, SAN samples clustered in two groups depending on the treatment. In the SAN from ivabradine-treated mice, the expression of nine ion channel subunits, including Navβ1 (–25%), Cav3.1 (–29%), Kir6.1 (–28%), Kvβ2 (–41%), and Kvβ3 (–30%), was significantly decreased. Eight genes were significantly upregulated, including K⁺ channel α-subunits (Kv1.1, +30%; Kir2.1, +29%; Kir3.1, +41%), hyperpolarization-activated cation channels (HCN2, +24%; HCN4, +52%), and connexin 43 (+26%). We conclude that reducing HR induces a complex remodeling of ion channel expression in the SAN but has little impact on ion channel transcripts in the ventricle.

electrocardiogram; gene expression; ivabradine

NEW GENOMICS APPROACHES, based on high-throughput gene expression profiling, have just begun to provide information on the transcriptional consequences of cardiac therapies, i.e., pharmacological remodeling (37, 40, 42). In this context, we have recently shown that chronic amiodarone induces a complex remodeling of ion channel transcript expression in the mouse ventricle (20). Ionic remodeling related to amiodarone could not be explained by the hypothyroid syndrome induced by the drug, because it markedly differed from that produced by hypo-

thyroidism alone in the same mouse model (19). Because a remarkable feature of amiodarone was also to produce a moderate heart rate reduction, we wondered whether heart rate reduction per se could impact ion channel expression in the heart.

While the effects of tachycardia on ion channel gene expression are well described (1, 17, 31, 34, 48), much less is known about the consequences of bradycardia. In the context of atrial fibrillation, a moderate heart rate reduction with β-blockade was shown to prevent or reverse cardiac electrical remodeling (47). In this latter situation, however, direct regulation of gene expression by decreased β-adrenergic input rather than heart rate reduction could explain the results. Strong bradycardia, such as in complete atrioventricular block, is known to produce hypertrophy and electrical remodeling (45). Schoenmakers et al. (39) showed that, in the atrioventricular block dog model, electrical remodeling precedes ventricular hypertrophy. In this model, however, heart rate is profoundly reduced.

The only way to chronically and moderately reduce heart rate in the mouse model is to use a pharmacological agent. Ivabradine (S 16257-2) is a selective inhibitor of the cardiac pacemaker hyperpolarization-activated current (*I_f* current) (2, 4, 43), which dose dependently reduces heart rate in humans and animals without altering the atrioventricular or intraventricular conduction or contractility (11, 28, 36, 41). Most importantly, a feature of ivabradine is that it does not target the ventricle, whereas other bradycardic agents such as β-blockers, digitalis, or Ca²⁺ channel inhibitors do. We thus used ivabradine to investigate the effects of moderate and chronic heart rate reduction on ion channel transcript expression in the mouse. Our results demonstrate that chronic heart rate reduction only slightly affects the expression of ion channels in the ventricle, thus ruling out the possibility that amiodarone effects on ion channel expression are caused by bradycardia. Inversely, our data demonstrate that lowering heart rate induces a complex remodeling of ion channel expression in the mouse sinoatrial node (SAN).

METHODS

Animals and Ivabradine Treatment

Animal protocols were approved by our Institutional Animal Care and Use Committee and performed in compliance with European directives (861609/CEE). Ivabradine hydrochloride was supplied by the Institut de Recherches Internationales Servier (Courbevoie, France). The drug was diluted in sterile water at a concentration of 0.5 mg/ml free-base ivabradine. Fresh drug solution was prepared weekly.

After a 2-wk acclimatization period on a 12:12-h light-dark cycle (with light on at 8:30 AM), 48 10-wk-old C57BL/6 male mice (Charles River, L'Arbresle, France) were randomized to receive either

* A.-L. Leoni and C. Marionneau contributed equally to this work.

Article published online before print. See web site for date of publication (<http://physiolgenomics.physiology.org>).

Address for reprint requests and other correspondence: F. Charpentier, INSERM U533, L'Institut du thorax, Faculté de médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex, France (e-mail: flavien.charpentier@nantes.inserm.fr).

vehicle or 5 mg/kg ivabradine given orally twice daily (total daily dose of 10 mg/kg) for 3 wk. Administrations were performed by gavage between 8:30 and 9:00 AM and 8:30 and 9:00 PM. The last administration was performed at days 23–24 in the morning.

At least 1 wk before the treatment period, a subgroup of nine mice were implanted with a telemetric device, allowing the measurement of electrocardiogram (ECG) parameters and activity. Animals were anesthetized with an intraperitoneal (ip) injection of etomidate (35 mg/kg). Local anesthesia was obtained with lidocaine (1%) injected subcutaneously at the sites of electrodes and transmitter implantation. A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20; Data Sciences International, St. Louis, MO) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax (chest bipolar ECG lead). Five of these mice were randomly assigned to the ivabradine group and four to the vehicle group.

ECG Recordings

In conscious mice. Telemetric ECG signals were computer recorded with the use of a telemetry receiver and an analog-to-digital conversion data acquisition system for display and analysis by Dataquest A.R.T. (Data Sciences International) and ECG auto 1.5.11.26 (EMKA Technologies, Paris, France) software. Data recordings were obtained for 48 h after each week of treatment [on day 7 (D7) and D8, D14 and D15, D21 and D22] starting 30 min before the morning administration.

In anesthetized mice. In both vehicle and ivabradine groups, one-lead ECG recordings (*lead I*) were obtained with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585; EMKA Technologies) for later analysis and measurements with ECG auto 1.5.7 (EMKA Technologies). ECG recordings were obtained 2 min after anesthesia with etomidate (30 mg/kg ip) and 10 min after subsequent injection of atropine sulfate (0.5 mg/kg ip) and propranolol (1 mg/kg ip). The ECG recordings were obtained 24 h before the first administration and then on D8–D9, D15–D16, and D21–D22 after the first administration. They were performed 3–4 h after the morning administration.

Criteria used for measuring RR, PR, QRS, and QT intervals as well as P wave duration have been reported previously (18). QT intervals were corrected (QTc) for heart rate using the formula, $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$, with QT and RR measured in milliseconds (27).

RNA Preparation

Under general anesthesia with etomidate (30 mg/kg ip), mice were killed by cervical dislocation and the beating hearts quickly excised. A thin strip of SAN tissue ($\sim 1 \times 0.8$ mm), limited by crista terminalis, atrial septum, and orifices of the venae cavae, was cut from the right atrium as previously described (24, 26) and flash frozen in liquid nitrogen for further RNA isolation. Both right and left ventricles were dissected and frozen together. Total RNA from individual ventricular preparations and from pools of two SANs was isolated and DNase treated using the RNeasy Fibrous Tissue Mini and Micro Kit (Qiagen), respectively. The quality of total RNA was assessed by microelectrophoresis on acrylamide gel (Agilent 2100 Bioanalyzer). Lack of genomic DNA contamination was checked by PCR amplification of total RNA samples without prior cDNA synthesis.

TaqMan Real-Time RT-PCR

TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process to characterize the ion channel gene expression patterns of five pools of SANs and six individual ventricular preparations from the vehicle group and six pools of SANs and six ventricular preparations from the ivabradine-treated group. First strand cDNA was synthesized from 220 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then carried out in Low Density Array using the AB

PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each array were preloaded with 96×4 predesigned TaqMan probes and primers (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). The probes were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM, Applera) on the 5'-end and with nonfluorescent quencher on the 3'-end. The genes selected for their cardiac expression encode 68 ion channel α - and auxiliary subunits, 9 proteins involved in calcium homeostasis, 5 transcription factors, specific markers of cardiac regions, vessels, neuronal tissue, fibroblasts, inflammation and hypertrophy, and 4 endogenous control genes used for normalization. Two nanograms of cDNA combined with $1 \times$ TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) were loaded into each well. The Low Density Arrays were thermal cycled at 50°C for 2 min and 94.5°C for 10 min, followed by 40 cycles of 97°C for 30 s and 59.7°C for 1 min. Data were collected with instrument spectral compensations by the Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed using the threshold cycle (C_T) relative quantification method (23). Data were normalized using an internal control gene. Genes with $C_T > 32$ were eliminated for lack of reproducibility. The outliers were excluded using a robust statistical modified z-score method based on the median of absolute deviation (26). The nonexcluded values ($n = 4$ –6) were used for the $2^{-\Delta C_T} \times 100$ calculation; $2^{-\Delta C_T}$ corresponds to the ratio of each gene expression vs. internal control gene.

The expression of genes encoding hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel (HCN)4 and Kir3.4 was quantified by individual TaqMan real-time PCR (TaqMan Gene Expression Assays were not available for Low Density Array experiments). PCR reactions were performed on 10 ng of cDNA using TaqMan Gene Expression Assay designed by Applied Biosystems. Amplifications were performed in duplicate. Data were normalized and expressed as described above.

Two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene expression matrix consisting of the 23 tissue samples and 79 analyzed genes. The input consisted of the ΔC_T for each gene and sample. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using the Cluster program (10). Clusters were visualized using the TreeView program.

Assay of Ivabradine and S 18982 Plasma Levels

On the day of the last administration (D23–D24), blood samples were collected to assess plasma levels of ivabradine and its main active metabolite S 18982 at six different times: just before the administration (i.e., 12 h after last gavage) and 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, and 8 h postadministration. For each sampling time, venous blood from four mice was collected. Levels of ivabradine and S 18982 were evaluated using a validated method involving liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection.

Statistical Analysis

Plasma levels of ivabradine and S 18982 are expressed as means $\pm$ SD. All other data are expressed as means $\pm$ SE. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test and one- or two-way analysis of variance completed by a Tukey's test when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

On the basis of our previous study (20), we planned to evaluate ion channel expression under experimental conditions leading to a moderate (i.e., 15–20%) decrease in heart rate. ECG recordings on freely moving mice showed that ivabradine at 5 mg/kg twice daily increased the mean RR interval over a 24-h period by 16% (from 109 ± 4 ms in the vehicle group to 127 ± 2 ms in the ivabradine group; $P < 0.01$, $n = 4$ and 5, respectively) after 8 days of treatment. This effect was constant

throughout the 3-wk period of the study with RR intervals of 110 ± 4 ms and 112 ± 4 ms after 8 and 22 days with vehicle, respectively, and 128 ± 5 ms ($P < 0.01$ vs. vehicle; +16%) and 129 ± 4 ms ($P < 0.05$; +15%) after the same periods with ivabradine.

The effects of ivabradine on heart rate in freely moving mice are shown in Fig. 1. Administration of ivabradine induced a progressive prolongation of the RR interval, which was maximal at about 1 h and remained stable for 4–6 h (see Fig. 1A). This correlated with the plasma levels of ivabradine, which reached 172 ± 55 ng/ml (~ 0.35 μ M) 1 h after administration (after a transient peak to 450 ± 34 ng/ml) and then declined progressively to 41 ± 16 ng/ml (~ 0.08 μ M) and 14 ± 5 ng/ml (~ 0.02 μ M) 4 and 8 h after administration, respectively. Ivabradine's active *N*-demethylated metabolite S 18982 showed a similar pattern with a maximum concentration of 47 ± 4 ng/ml. As shown in Fig. 1B, the effects of ivabradine on heart rate measured during 12-h light or dark periods were consistently more pronounced during nighttime over the 3-wk administration; the mean RR interval over 12 h in the ivabradine group was 16–21% longer than in the vehicle group during nighttime and 11–13% longer during daytime.

Under anesthesia and after blockade of the autonomic nervous system, the heart rate of ivabradine-treated mice was 30–40% lower than in the vehicle group (Fig. 2 and Table 1; data obtained 3–4 h after morning administration). Ivabradine had no significant effect on atrial, atrioventricular, and ventric-

ular conduction parameters. Similarly, ventricular repolarization was not affected, since the corrected QT interval was not modified (Table 1). We did not observe any altered expression of genes encoding for brain natriuretic peptide, skeletal and cardiac α -actin, or the β -myosin heavy chain, demonstrating the absence of even mild ventricular hypertrophy.

An overview of gene expression data is provided by a two-way hierarchical clustering analysis of genes and cardiac tissues (Fig. 3). In this global analysis, the samples are linked to a tree. The size of the tree branches indicates the distance between the clusters: the higher the branch size, the more significant the separation between the clusters. Inversely, small branch size indicates low-significance clustering. Hierarchical clustering revealed a clear separation between transcript expression pattern of ventricular samples and SANs, confirming our previous findings (26). This analysis also showed an absence of discrimination between ventricular samples from the vehicle and ivabradine-treated groups, indicating that heart rate reduction had little effect on ventricular ion channel transcripts. In contrast, SAN samples clustered separately in two distinct groups depending on the treatment, although the degree of discrimination was mild as indicated by the small size of the tree branches.

Figures 4–6 show the effects of sustained moderate heart rate reduction on the expression of genes encoding ion channel subunits and Ca^{2+} homeostasis regulators in the SAN. Among the voltage-gated Na^+ channel subunits, the β -subunit Nav β 1

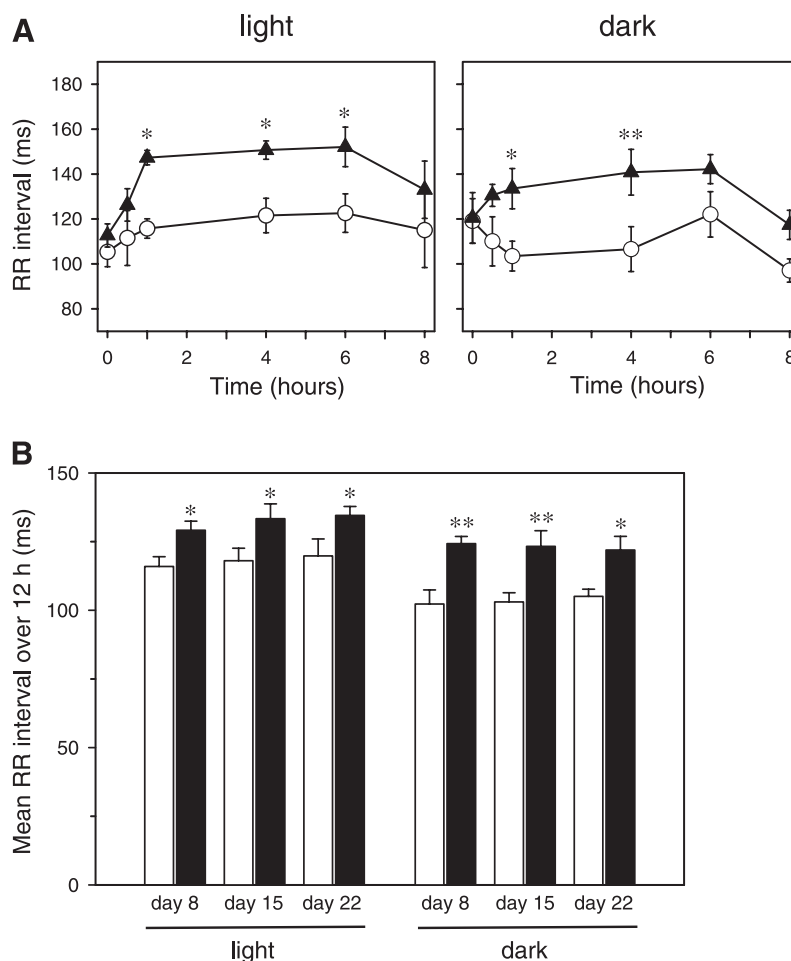


Fig. 1. Ivabradine effects on heart rate in freely moving mice. A: evolution of the RR interval (y-axis) during the 8 h after administration (time 0) of either 5 mg/kg ivabradine (ivabradine group, ▲; $n = 4$) or vehicle (vehicle group, ○; $n = 4$) during daytime (light, left) and nighttime (dark, right) after 8 days of treatment. B: mean RR intervals during 12-h daytime (light) and nighttime (dark) periods after 8, 15, and 22 days of treatment with vehicle (open bars; $n = 4$) or ivabradine (solid bars; $n = 5$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. corresponding value in the vehicle group.

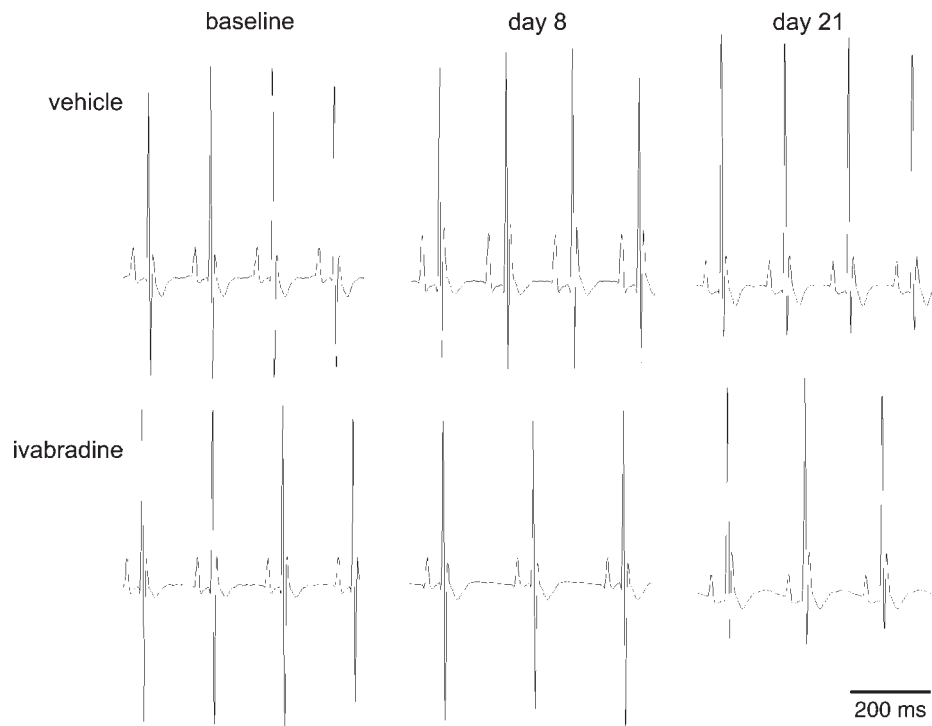


Fig. 2. Ivabradine effects on cardiac electrical activity in anesthetized mice. Representative ECG recordings obtained in one mouse from the vehicle group (top) and one mouse from the ivabradine group (bottom) under baseline conditions (24 h before starting the treatment) and after 8 and 21 days of treatment.

(*Scn1b*) was negatively regulated (Fig. 4). Similarly, only one Ca^{2+} channel subunit, Cav3.1 (*Cacna1g*), was downregulated. The gap junction protein expressed in the mouse SAN, Cx43 (*Gja1*), was upregulated. Most of the remodeling concerned K^{+} channel gene families and their regulators (Fig. 5). Among the α -subunits, only one voltage-gated channel, Kv1.1 (*Kcna1*), was regulated in a positive way. One of the α -subunits forming the pore of the inward rectifier K^{+} channel I_{K1} , Kir2.1 (*Kcnj2*), was upregulated. Kir2.2 (*Kcnj12*) expression was also moderately, albeit not significantly, increased. Similarly, Kir3.1 (*Kcnj3*), which generates the acetylcholine-activated K^{+} channel $I_{\text{K,Ach}}$, was upregulated. Two other K^{+} channels α -subunits, Kir6.1 (*Kcnj11*) and SK2 (*Kcnn2*), were downregulated. Among the K^{+} channel regulatory proteins, the β -subunits Kv β_2 (*Kcnab2*), Kv β_3 (*Kcnab3*), and minK (*Kcne1*) were downregulated, whereas SAP97 (*Dlgh1*), a membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein known to regulate voltage-dependent and inward rectifier K^{+} channels (12, 21), was upregulated. Hyperpolarization-activated cation channels (HCN) are key elements of the SAN automaticity. Among the three HCN channels expressed in mouse SAN, HCN2 and

HCN4 were significantly upregulated by 25 ± 7 and $52 \pm 6\%$, respectively. Finally, chronic heart rate reduction also affected regulators of Ca^{2+} homeostasis including the type 2 ryanodine receptor (*Ryr2*) and the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor RIP3-2 (*Itpr2*; Fig. 6).

Heart rate reduction-induced ionic remodeling was much less extensive at the ventricular level, and only six genes were significantly up- or downregulated in mice treated with ivabradine. For these genes, the variations were similar to those observed in SAN tissue. The expression of Cav3.1 was downregulated by $41 \pm 9\%$, Sk2 by $19 \pm 3\%$, and Kv β_3 by $39 \pm 8\%$, whereas SAP97, Kir2.2, and Cav α 2 δ_2 (*Cacna2d2*) were upregulated by 15 ± 1 , 22 ± 2 , and $27 \pm 9\%$, respectively. For Kir2.2 and Cav α 2 δ_2 , variations in the SAN were comparable but did not reach significance (respectively, $+14 \pm 3$ and $+23 \pm 8\%$; see Figs. 4 and 5).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that moderate chronic heart rate reduction as produced specifically by a drug that does

Table 1. ECG parameters in anesthetized mice from vehicle and ivabradine groups before and after treatment

	RR, ms		P, ms		PQ, ms		QRS, ms		QT, ms		QTc	
	Veh	Iva	Veh	Iva	Veh	Iva	Veh	Iva	Veh	Iva	Veh	Iva
Baseline	150 $\pm$ 4	164 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0	39 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	12 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	67 $\pm$ 2	71 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1
Day 7	171 $\pm$ 11	221 $\pm$ 3 $\ddagger$	14 $\pm$ 1	12 $\pm$ 0	42 $\pm$ 2	41 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	76 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2*	58 $\pm$ 3	56 $\pm$ 1
Day 14	161 $\pm$ 3	228 $\pm$ 8 $\ddagger$	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 0	40 $\pm$ 1	41 $\pm$ 1	13 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	68 $\pm$ 2	86 $\pm$ 3 $\ddagger$	54 $\pm$ 1	57 $\pm$ 2
Day 21	155 $\pm$ 5	202 $\pm$ 6 $\ddagger$	13 $\pm$ 1	13 $\pm$ 0	40 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	74 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2 $\ddagger$	60 $\pm$ 2	60 $\pm$ 2

Data are means $\pm$ SE. Electrocardiogram (ECG) parameters in anesthetized mice from vehicle (Veh; $n = 6$) and ivabradine (Iva; $n = 9$) groups before treatment (baseline) and after 7, 14, and 21 days of treatment. ECGs were recorded 10 min after blockade of the autonomic nervous system with ip injection of atropine sulfate (0.5 mg/kg) and propranolol (1 mg/kg). RR, RR interval; P, P wave duration; PQ, PQ interval; QRS, QRS complex duration; QT, QT interval; QTc, corrected QT interval. * $P < 0.05$, $\ddagger P < 0.01$, and $\ddagger\ddagger P < 0.001$ vs. vehicle group.

not target the ventricle induces a complex ionic remodeling in the SAN but has only a slight impact on ion channel expression in the ventricle. To our knowledge, this is the first report of pharmacological ionic remodeling induced by a specific ion channel inhibitor.

Comparison With Previous Studies

In the present study, the effects of ivabradine on heart rate were in the same order of magnitude as in other experimental models using comparable doses (8, 29) and, more importantly, corresponded to the therapeutic heart rate reduction obtained in patients (3, 25). Ivabradine treatment had no effect on atrial, atrioventricular, and ventricular electrical activity as previously described (11, 28, 41, 43). There was also no sign of even mild ventricular hypertrophy.

Heart Rate Reduction-Induced Ionic Remodeling in the Ventricle

In a recent study, we have shown that chronic amiodarone treatment induces a complex ionic remodeling in the mouse ventricle (20) that differed markedly from that produced by hypothyroidism in the same model (19). Because amiodarone induced a moderate bradycardia, we hypothesized that part of the ventricular ionic remodeling could be attributable to slowing of the heart rate. Our new data rule out this hypothesis. Indeed, we have now shown that ivabradine modified the expression of only six transcripts and also that the change in the expression pattern differed from that observed in the amiodarone situation. As an example, the expressions of Cav3.1 and Kir2.2 were not affected by amiodarone. Moreover, SK2 expression, which was downregulated under ivabradine treatment, was inversely upregulated by amiodarone. It is therefore unlikely that bradycardia participates to the ventricular ionic remodeling induced by chronic amiodarone. In this latter situation, ionic remodeling is more likely a mixed consequence of the cardiac hypothyroid syndrome, the direct effect of amiodarone/desethylamiodarone on gene promoters and the primary physiological changes induced by the inhibition of the multiple sarcolemmal targets of this nonspecific drug (16, 20).

Although limited, both in the number of affected genes and in the amplitude of the variations, some degree of ionic remodeling was observed in the mouse ventricle, suggesting that a moderate decrease in heart rate can affect cardiac gene expression. This remodeling was actually too small to be detected with two-way hierarchical clustering, a method sensitive enough to discriminate different mouse strains based on their ventricular ion channel gene expression profiles (6). Strong bradycardia, as in complete atrioventricular block, was previously shown to induce ventricular electrical remodeling (45). However, complete atrioventricular block also induces ventricular hypertrophy associated with ionic and electrical remodeling (see Ref. 32 for review). In complete atrioventricular block, ionic remodeling was recently proposed to be the primary consequence of heart rate reduction and not a secondary effect of ventricular hypertrophy (39). In addition, strong bradycardia induces prolonged repolarization, altered Ca^{2+}

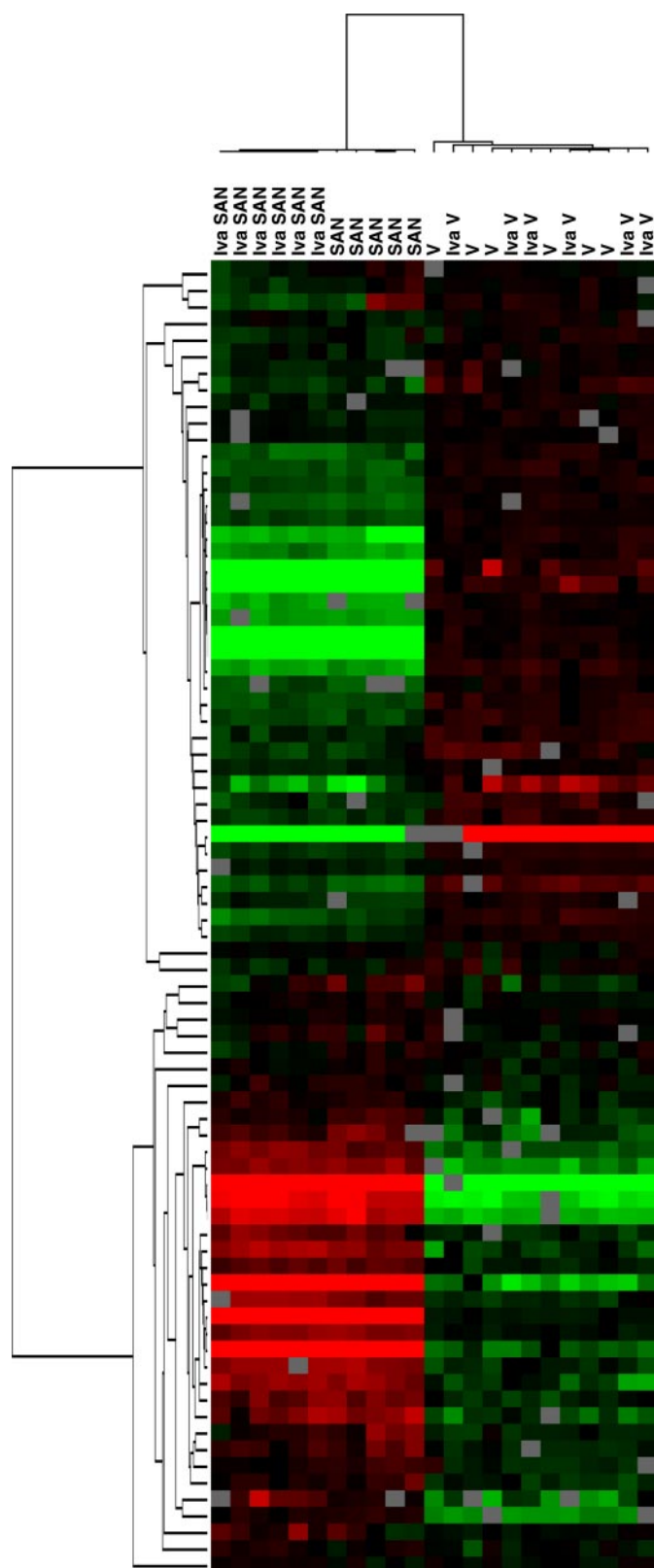


Fig. 3. Two-way hierarchical clustering applied to 79 genes (vertical axis) and to 5 pools of sinoatrial nodes (SANs) and 6 ventricles from the vehicle group (SAN and V, respectively) and 6 pools of SANs and 6 ventricles from the ivabradine group (Iva SAN and Iva V, respectively). The input consisted of ΔC_T for each preparation and gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each pool of SANs or each ventricle by a single column. Each color patch represents gene expression level, with a continuum of expression levels from dark green (lowest) to bright red (highest). Gray boxes correspond to missing values. C_T , threshold cycle.

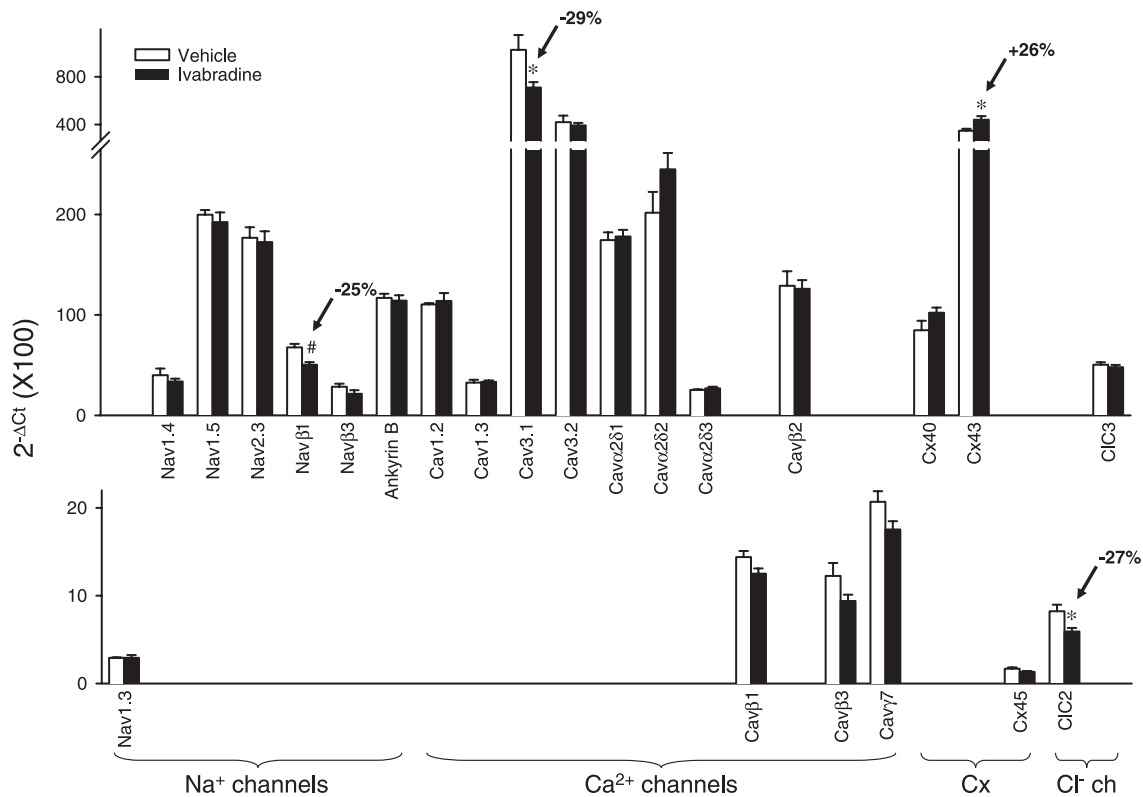


Fig. 4. Ivabradine effects on the expression of Na⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ channels and connexins in SAN. Bar graphs show the relative quantification vs. internal control gene (y-axis) of genes selected for their cardiac expression (x-axis) in mice treated with vehicle (open bars) or ivabradine (solid bars). *Bottom:* low-expressed genes. Data are means $\pm$ SE from 4–6 pools of SAN. * $P < 0.05$ and # $P < 0.01$ vs. vehicle group.

homeostasis, and arrhythmias. Conversely, moderate heart rate reduction induced by ivabradine does not alter ventricular function. Several studies suggest that, in pathological situations such as heart failure, heart rate reduction could even prevent or reverse cardiac remodeling (22, 29, 30).

Heart Rate Reduction-Induced Ionic Remodeling in the SAN

Heart rate reduction-induced ionic remodeling was more extensive in the SAN. Among the regulated genes are genes encoding channels directly involved in automaticity, such as HCN2 and HCN4. Interestingly, HCN2 and HCN4 channels are the targets for ivabradine. Upregulation of these pacemaker channels could be interpreted as a tentative compensatory mechanism, although this did not translate, in terms of heart rate, in a loss of efficacy of ivabradine, since a similar heart rate reduction was maintained over the 3-wk administration of a constant dose. HCN genes are specifically regulated in the SAN and not in the ventricle, where they have no assigned role despite their high expression (26). One could therefore speculate that upregulation of HCN genes involves a positive-feedback pathway. Positive- or negative-feedback mechanisms involving in part transcriptional regulation are well described for seven-transmembrane domain receptors such as β -adrenoceptors (33, 35, 46). To our knowledge, the only description of such a regulation process for ion channels concerns cardiac Na⁺ channels: in rats, blockade of Na⁺ channels with mexilitine results in the upregulation of Na⁺ channel transcription (9). The fact that HCN1 expression was not altered illustrates the specificity of gene transcription regulation (38).

Another important gene in the regulation of the pacemaker activity is Kir2.1. The impact of its upregulation by chronic heart rate reduction is more difficult to comprehend. Because the amplitude of the inward rectifier K⁺ current in mouse SAN cells is low (5), a 30% increase in Kir2.1 expression would possibly lead to a small hyperpolarization, which could either decrease sinus rate, by counterbalancing diastolic inward currents, or inversely, increase sinus rate because of a larger activation of pacemaker and T-type Ca²⁺ channels. To this respect, the observation that HCN2 and HCN4 channel transcripts are also upregulated suggests the existence of a transcriptional cross talk between HCN and Kir2 channel expression. This hypothesis is supported by the fact that Kir2.1 expression, like HCN2 and HCN4 expression, is not regulated by heart rate reduction in the ventricle, indicating tissue-specific regulation in the SAN. Such a mechanism can contribute to keep the proper setting of the voltage range in which the diastolic depolarization develops. The increased expression of SAP97 further complicates the situation, since this MAGUK protein was shown to interfere with Kir2 channels in a macromolecular complex (21). Finally, the gene encoding the type 2 ryanodine receptor is also specifically, though moderately, upregulated in the SAN. This could also compensate for the inhibition of I_f current, since ryanodine receptors were reported to play a role in the late phase of diastolic depolarization in SAN (14, 44).

The gene encoding the T-type Ca²⁺ channel Cav3.1 was downregulated by heart rate reduction. The contribution of T-type Ca²⁺ channels to cardiac automaticity has long been

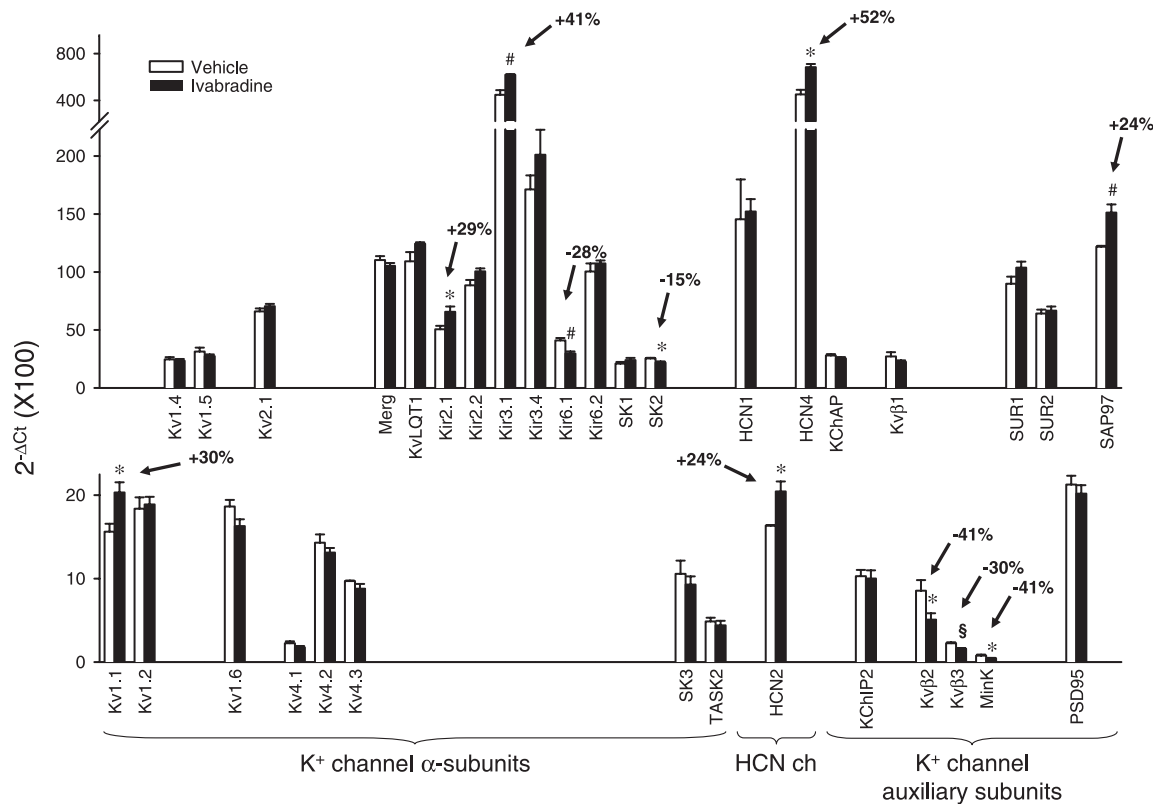


Fig. 5. Ivabradine effects on the expression of K^+ and hyperpolarization-activated cation channels (HCN ch) in SAN. Bar graphs show the relative quantification vs. internal control gene (y-axis) of selected genes (x-axis) in mice treated with vehicle (open bars) or ivabradine (solid bars). *Bottom*: low-expressed genes. Data are means $\pm$ SE from 4–6 pools of SAN. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, and § $P < 0.001$ vs. vehicle group.

controversial (7, 13), but recent results in the Cav3.1 knockout mouse model (15) demonstrate that this channel does participate to SAN pacemaker activity (Mangoni ME, unpublished observation). A decreased expression of Cav3.1 is therefore expected to slightly decrease the sinus rate. Similarly, the upregulation of Kir3.1, one of the acetylcholine-activated K^+ channel subunits, should potentiate heart rate

reduction under vagal stimulation. Interestingly, these two genes were regulated in the SAN but also in the ventricles, where their normal expression is much lower than in the SAN (26). This suggests that their regulation might be a consequence of chronic heart rate reduction rather than a direct consequence of HCN channel inhibition, as observed for Kir2.1 and Ryr2 channels.

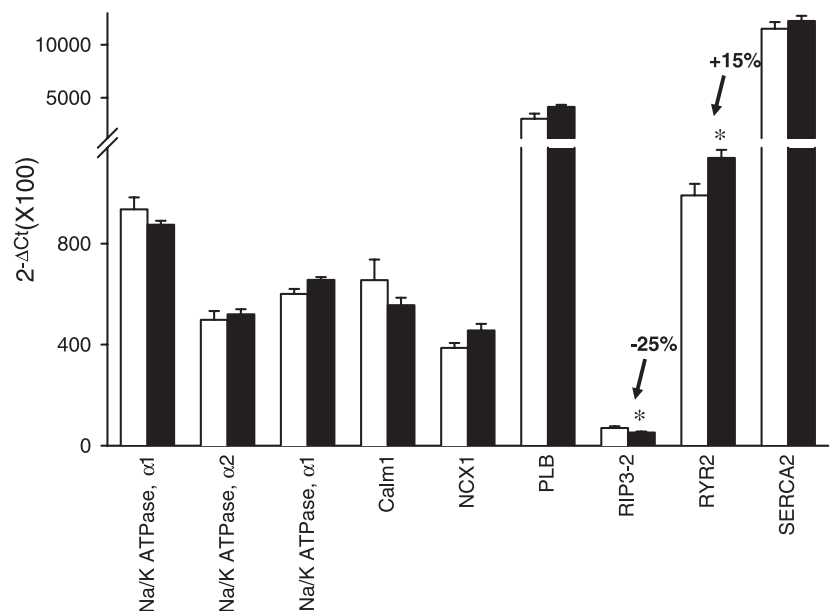


Fig. 6. Ivabradine effects on the expression of Ca^{2+} homeostasis regulators in SAN. Bar graphs show the relative quantification vs. internal control gene (y-axis) of selected genes (x-axis) in mice treated with vehicle (open bars) or ivabradine (solid bars). *Bottom*: low-expressed genes. Data are means $\pm$ SE from 4–6 pools of SAN. * $P < 0.05$ vs. vehicle group.

From our results, it appears that two types of ionic remodeling are induced by ivabradine. One, limited to the SAN, can be interpreted as a direct adaptive consequence of HCN channel inhibition. The second, observed in both SAN and ventricle, is more likely a secondary consequence of the new physiological status of the myocytes under heart rate reduction. Whatever the mechanism of ionic remodeling in SAN, it does not seem to have deleterious consequences. For instance, one might speculate that the upregulation of HCN channels would lead to increased heart rate on termination of ivabradine treatment. Experimental and clinical studies published so far show inversely an absence of such a rebound phenomenon (3, 29).

Message levels quantified in the present study are not necessarily correlated with protein expression, as with posttranscriptional and/or translational adaptation. However, in contrast to the recent progress in mRNA quantification that allows work with small tissues, even for genes expressed at low levels (as illustrated by the present study; see also Ref. 26), Western blotting needs a considerable amount of protein, which restrains its use with small specialized tissues such as sinus nodes.

In conclusion, the present study shows that reducing heart rate moderately with the I_f inhibitor ivabradine induces a complex ionic remodeling in the SAN. There was little impact on the ventricle in accordance with the absence of effects of the drug at the ventricular level. This result rules out our hypothesis that amiodarone-induced ventricular ionic remodeling could be partly due to heart rate reduction. Whether the remodeling observed in our study is a specific consequence of ivabradine inhibition of HCN channels or a more general consequence of long-term heart rate reduction should be further investigated in genetically engineered mice with conditional deletion of key pacemaker genes.

ACKNOWLEDGMENTS

We express gratitude to Drs. Florence Mahlberg-Gaudin and Claire Chezaubernard from the Institut de Recherches Internationales Servier for providing ivabradine and for helpful comments and to Dr. Amélie Gauvin-Bauduin for the plasma dosages. We also thank Béatrice Le Ray, Marie-Jo Louérat, and Agnès Carcouët (INSERM U533) for expert technical assistance.

GRANTS

This work was supported by a grant from the Ministère de la Recherche (Action Concertée Incitative "Biologie du développement et physiologie intégrative") to F. Charpentier.

REFERENCES

1. Allesie M, Ausma J, and Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54: 230–246, 2002.
2. Bois P, Bescond J, Renaudon B, and Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 118: 1051–1057, 1996.
3. Borer JS, Fox K, Jaillon P, and Lerebours G (for the Ivabradine Investigators Group). Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I_f inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled trial. *Circulation* 107: 817–823, 2003.
4. Bucci A, Baruscotti M, and DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I_f channels by ivabradine. *J Gen Physiol* 120: 1–13, 2002.
5. Cho HS, Takano M, and Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 550: 169–180, 2003.
6. Demolombe S, Marionneau C, Le Bouter S, Charpentier F, and Escande D. Functional genomics of cardiac ion channel genes. *Cardiovasc Res* 67: 438–447, 2005.
7. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55: 455–472, 1993.
8. Du XJ, Feng X, Gao XM, Tan TP, Kiriazis H, and Dart AM. I_f channel inhibitor ivabradine lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities. *Br J Pharmacol* 142: 107–112, 2004.
9. Duff HJ, Offord J, West J, and Catterall WA. Class I and IV antiarrhythmic drugs and cytosolic calcium regulate mRNA encoding the sodium channel α subunit in rat cardiac muscle. *Mol Pharmacol* 42: 570–574, 1992.
10. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, and Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8683–8688, 1998.
11. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, and Bennett T. Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol* 115: 579–586, 1995.
12. Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Goyenvalle C, and Hatem SN. Different isoforms of synapse-associated protein, SAP97, are expressed in the heart and have distinct effects on the voltage-gated K^+ channel Kv1.5. *J Biol Chem* 278: 47046–47052, 2003.
13. Hagiwara N, Irisawa H, and Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 395: 233–253, 1998.
14. Hata T, Noda T, Nishimura M, and Watanabe Y. The role of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in the regulation of sinoatrial node automaticity. *Heart Vessels* 11: 234–241, 1996.
15. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, and Shin HS. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking α_{1G} T-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 31: 35–45, 2001.
16. Kodama I, Kamiya K, and Toyama J. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res* 35: 13–29, 1997.
17. Lacroix D, Gluais P, Marquie C, D'Hoinne C, Adamantidis M, and Bastide M. Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 54: 42–50, 2002.
18. Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman A, Charpentier F, and Escande D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: Pharmacological profile. *Cardiovasc Res* 50: 328–334, 2001.
19. Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, Lande G, Siavoshian S, Baró I, Pond AL, Nerbonne JM, Leger JJ, Escande D, and Charpentier F. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res* 92: 234–242, 2003.
20. Le Bouter S, El Harchi A, Marionneau C, Bellocq C, Chambellan A, van Veen T, Boixel C, Gavillet B, Abriel H, Le Quang K, Chevalier JC, Lande G, Leger JJ, Charpentier F, Escande D, and Demolombe S. Long-term amiodarone administration remodels expression of ion channel transcripts in the mouse heart. *Circulation* 110: 3028–3035, 2004.
21. Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, and Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem* 279: 19051–19063, 2004.
22. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, and Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 109: 120–124, 2004.
23. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
24. Mangoni ME and Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_h) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 52: 51–64, 2001.
25. Manz M, Reuter M, Lauck G, Omran H, and Jung W. A single intravenous dose of ivabradine, a novel I_f inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction. *Cardiology* 100: 149–155, 2003.
26. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, and Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 562: 223–234, 2005.
27. Mitchell GF, Jeron A, and Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H747–H751, 1998.

28. Monnet X, Ghaleh B, Colin P, de Curzon OP, Giudicelli JF, and Berdeaux A. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 1133–1139, 2001.
29. Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, and Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective I_f current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* 109: 1674–1679, 2004.
30. Nagatsu M, Spinale FG, Koide M, Tagawa H, DeFreitas G, Cooper G 4th, and Carabello BA. Bradycardia and the role of β -blockade in the amelioration of left ventricular dysfunction. *Circulation* 101: 653–659, 2000.
31. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415: 219–226, 2002.
32. Nattel S, Khairy P, and Schram G. Arrhythmogenic ionic remodeling: adaptive responses with maladaptive consequences. *Trends Cardiovasc Med* 11: 295–301, 2001.
33. Nishikawa M, Mak JC, Shirasaki H, Harding SE, and Barnes PJ. Long-term exposure to norepinephrine results in down-regulation and reduced mRNA expression of pulmonary beta-adrenergic receptors in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 91–99, 1994.
34. Patberg KW and Rosen MR. Molecular determinants of cardiac memory and their regulation. *J Mol Cell Cardiol* 36: 195–204, 2004.
35. Pierce KL, Premont RT, and Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639–350, 2002.
36. Raguenau I, Laveille C, Jochemsen R, Resplandy G, Funck-Brentano C, and Jaillon P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 64: 192–203, 1998.
37. Remme WJ. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 17: 349–360, 2003.
38. Rosati B and McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res* 94: 874–883, 2004.
39. Schoenmakers M, Ramakers C, van Opstal JM, Leunissen JD, Londono C, and Vos MA. Asynchronous development of electrical remodeling and cardiac hypertrophy in the complete AV block dog. *Cardiovasc Res* 59: 351–359, 2003.
40. Shinagawa K, Derakhchan K, and Nattel S. Pharmacological prevention of atrial tachycardia induced atrial remodeling as a potential therapeutic strategy. *Pacing Clin Electrophysiol* 26: 752–764, 2003.
41. Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli JF, and Berdeaux A. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 659–666, 1995.
42. Swynghedauw B. Myocardial remodelling: pharmacological targets. *Expert Opin Investig Drugs* 11: 661–674, 2002.
43. Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, and Vilaine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol* 112: 37–42, 1994.
44. Vinogradova TM, Zhou YY, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, and Lakatta EG. Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ Res* 94: 802–809, 2004.
45. Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, van der Zande J, Leunissen HD, Cleutjens JP, van Bilsen M, Daemen MJ, Schreuder JJ, Allesie MA, and Wellens HJ. Enhanced susceptibility for acquired torsade de pointes arrhythmias in the dog with chronic, complete AV block is related to cardiac hypertrophy and electrical remodeling. *Circulation* 98: 1125–1135, 1998.
46. Witte K, Schnecko A, Hauth D, Wirz S, and Lemmer B. Effects of chronic application of propranolol on beta-adrenergic signal transduction in heart ventricles from myopathic BIO TO2 and control hamsters. *Br J Pharmacol* 125: 1033–1041, 1998.
47. Workman AJ, Kane KA, Russell JA, Norrie J, and Rankin AC. Chronic beta-adrenoceptor blockade and human atrial cell electrophysiology: evidence of pharmacological remodelling. *Cardiovasc Res* 58: 518–525, 2003.
48. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varró A, and Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 561: 735–748, 2004.

Résultats

L'effet d'une bradycardie modérée chronique sur l'expression des gènes codant pour les sous-unités des canaux ioniques a donc été évalué dans le ventricule de souris C57BL/6 mâles adultes traitées par gavage avec une solution d'ivabradine (5 mg/kg, 2 fois par jour) pendant 3 semaines.

Des enregistrements ECG sur souris vigiles ont permis de valider une diminution stable de la fréquence cardiaque sur 24h (-16% en moyenne) après 8 jours de traitement. Cet effet était maintenu tout au long des trois semaines de traitement (figure 2, article 4, page 122). L'administration d'ivabradine induisait un allongement progressif de la durée de l'intervalle RR qui était maximal après une heure et restait stable pendant 4 à 6 heures (figure 1A). Cet effet était corrélé aux taux plasmatiques d'ivabradine qui atteignaient un pic transitoire 30 minutes après l'administration et déclinaient ensuite progressivement. Le métabolite actif de l'ivabradine, le S 18982 montrait une cinétique similaire (Figure 37).

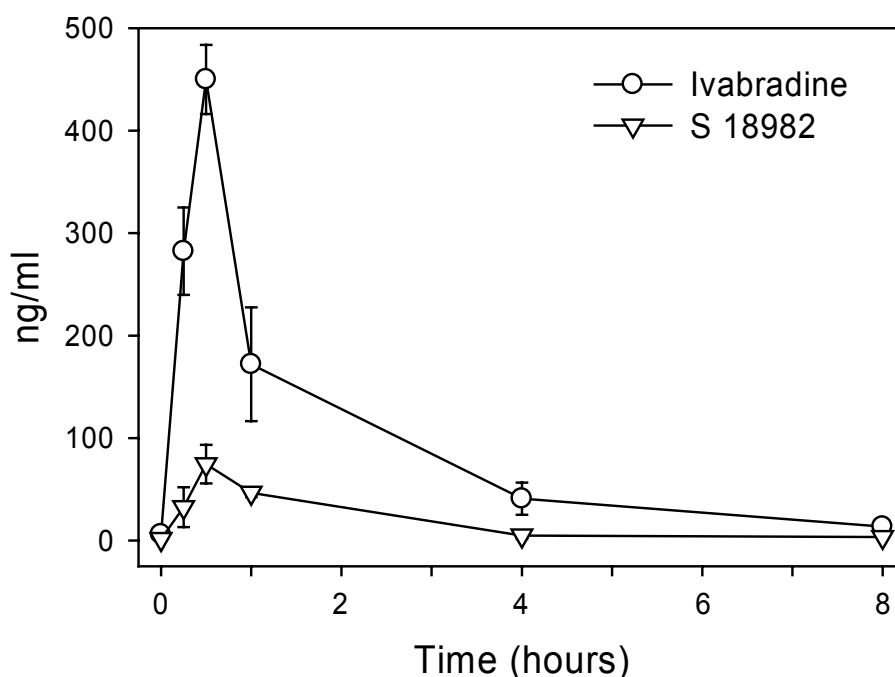


Figure 37 : Concentrations plasmatiques d'ivabradine et de S 18982 chez la souris après administration orale d'ivabradine à la dose de 5mg/kg.

Les effets d'une administration d'ivabradine sur la durée de l'intervalle RR étaient plus prononcés en période de nuit qu'en période de jour au cours des 3 semaines de traitement (Figure 1B, article 4, page 122). La durée moyenne de l'intervalle RR sur 12h était allongée de 16 à 21% en période de nuit dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle, tandis que cet allongement était de 11 à 13% en période de jour.

Afin de vérifier que la bradycardie était présente chez les animaux sur lesquels nous allions faire l'analyse moléculaire, des ECG sous anesthésie ont été réalisés une fois par semaine, 3 à 4 heures après l'administration. Après blocage du système nerveux autonome, l'allongement de la durée de l'intervalle RR était de 30 à 40 % dans le groupe traité avec l'ivabradine par rapport au groupe ayant reçu le véhicule (Tableau 1, Figure 2, article 4, page 122). Aucune altération des autres paramètres ECG n'a été observée, démontrant ainsi un modèle de bradycardie modérée pure.

L'analyse du remodelage ionique dans le ventricule et dans le nœud sinusal a été réalisée à la fin des 3 semaines de traitement par RT-PCR quantitative à haut-débit grâce à l'utilisation de Low Density Arrays. Tout d'abord, il est à noter qu'aucune modification de l'expression des gènes codant le peptide natriurétique de type B (BNP), l' α -actine cardiaque ou squelettique, ou encore la chaîne lourde β de la myosine n'a été observée dans le ventricule démontrant ainsi l'absence d'hypertrophie ventriculaire dans ce modèle.

Une classification hiérarchique des données d'expression obtenues a fourni plusieurs informations (Figure 3, article 4, page 122). D'une part, une séparation claire entre les profils d'expression des ventricules et des nœuds sinusaux existe, indépendamment du traitement, confirmant ainsi les précédents travaux de Marionneau *et al.* (2005). D'autre part, l'absence de discrimination entre les ventricules des souris contrôles et ceux des souris traitées indique que le traitement affecte peu l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques dans le ventricule. L'expression de 6 gènes seulement était significativement modifiée. Ces gènes codent pour deux sous-unités des canaux calciques ($\text{Ca}_v3.1$ et $\text{Cav}2\delta2$), des sous-unités de canaux potassiques ($\text{Kir}2.2$, $\text{Kv}\beta3$ et $\text{Sk}2$) et la protéine régulatrice SAP97. Enfin, les nœuds sinusaux sont séparés en deux groupes distincts en fonction du traitement, suggérant ainsi un remodelage ionique sinusal. Ce dernier est complexe puisqu'il touche toutes les familles de canaux ioniques (Figures 4 à 6, article 4, page 122). Parmi les sous-unités des canaux sodiques, seule l'expression de la sous-unité $\text{Na}_v\beta1$ était diminuée par un traitement chronique d'ivabradine. De même pour les canaux calciques, seule l'expression de la sous-unité $\text{Ca}_v3.1$ était diminuée. La connexine 43 quant à elle avait une expression augmentée. La majorité du remodelage observé concernait des sous-unités des canaux K^+ et leurs régulateurs. L'expression de la sous-unité $\text{Kv}1.1$ et des sous-unités $\text{Kir}2.1$ et $\text{Kir}2.2$ était régulée positivement, comme la sous-unité $\text{Kir}3.1$ des canaux K^+ activés par l'acétylcholine. Deux autres sous-unités α des canaux K^+ avaient une expression diminuée, les sous-unités $\text{Kir}6.1$ et $\text{SK}2$. Enfin, les sous-unités régulatrices $\text{Kv}\beta2$, $\text{Kv}\beta3$ et minK avaient une expression diminuée, tandis que l'expression de la protéine SAP97, connue pour réguler les canaux K^+ dépendant du potentiel (Kv) et rectifiant entrant (Kir), était diminuée. Parmi les trois sous-unités des canaux HCN exprimées dans le nœud

sinusal chez la souris, HCN2 et HCN4 avaient une expression augmentée après trois semaines de traitement avec l'ivabradine. Enfin, parmi les régulateurs de l'homéostasie calcique, l'expression de deux gènes était modifiée. Ils codaient pour le récepteur de type 2 à la ryanodine (RYP2) et le récepteur de type 2 à l'inositol trisphosphate (RIP3-2) du réticulum sarcoplasmique.

C. Discussion - Conclusion

Notre étude démontre qu'une réduction chronique et modérée de la fréquence cardiaque, obtenue pharmacologiquement par l'administration d'un inhibiteur spécifique des canaux HCN, induit un remodelage complexe de l'expression des canaux ioniques dans le nœud sinusal mais a peu de répercussions sur leur expression dans le tissu ventriculaire.

Pour la première fois, cette étude démontre des modifications d'expression transcriptionnelle des canaux ioniques dans le cœur après l'administration d'un agent bradycardisant spécifique. L'utilisation d'une technique de RT-PCR à haut débit, nous a permis d'obtenir des données pour un grand nombre de gènes, et de travailler à partir de tissus de petite taille. A ce jour, la petite taille des tissus sinusaux chez la souris ne permet pas d'envisager une quantification de l'expression protéique d'un aussi grand nombre de gènes.

Le niveau de bradycardie obtenue avec deux administrations quotidiennes d'ivabradine (5 mg/kg) correspond à la réduction moyenne recherchée en clinique pour son effet thérapeutique (Borer *et al.*, 2003). L'effet obtenu après chaque administration se maintenait pendant 6 à 8 heures. La fréquence cardiaque revenant pendant 4 heures à un niveau quasi normal. Nous aurions pu procéder à 3 administrations quotidiennes d'une dose moins élevée, mais comme nous souhaitons nous trouver dans des conditions proches de celles de l'administration de l'ivabradine en clinique, nous sommes restés à deux administrations.

Le remodelage ionique sinusal est difficile à interpréter. Parmi les gènes régulés, beaucoup sont connus pour leur rôle clef dans l'automatisme. De façon intéressante, la sur-expression des gènes codant pour les canaux HCN2 et HCN4, cibles de l'ivabradine (Thollon *et al.*, 1994 ; Bois *et al.*, 1996 ; Bucchi *et al.*, 2002), pourrait être interprétée comme un mécanisme de compensation, ou autrement dit un rétro-contrôle positif. Au contraire, la diminution d'expression du gène codant pour la sous-unité $Ca_v3.1$, pourrait conduire à une légère diminution du rythme cardiaque comme le laisse penser l'étude de Mangoni *et al.*, (article 1, page 100, 2006). De la même façon, la sur-expression du gène codant pour la

sous unité Kir3.1 responsable du courant $I_{K,Ach}$, pourrait potentialiser la bradycardie sous stimulation vagale. La sur-expression des gènes codant pour les sous-unités Kir2.1, et Kir2.2 (bien que non significative) est plus difficile à interpréter. L'hyperpolarisation que pourrait induire ces sur-expressions pourrait en effet, soit ralentir la dépolarisation diastolique et donc ralentir le rythme cardiaque, soit induire une plus forte activation des canaux HCN et des canaux Ca^{2+} de type T, conduisant ainsi à une accélération du rythme. La sur-expression du gène codant pour la protéine SAP97 appartenant à la famille MAGUK, complique encore la situation puisque cette protéine est connue pour interagir et moduler l'expression fonctionnelle de nombreux canaux tels que ceux de la famille des Kir2.x (Leonoudakis *et al.*, 2004). Il paraît donc indispensable maintenant d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ce remodelage sur les propriétés des courants ioniques que ces sous-unités génèrent.

En ce qui concerne le remodelage dans le ventricule, il est intéressant de noter que les 6 gènes dont l'expression est significativement modulée présentent les mêmes variations d'expression dans le nœud sinusal. Trois autres gènes présentent également les mêmes variations d'expression dans le ventricule et dans le nœud sinusal, bien qu'elles n'atteignent pas le seuil d'une différence statistique dans le ventricule. Ces gènes codent une sous-unité des canaux sodiques $Na_v\beta1$ et deux sous-unités des canaux K^+ , Kir3.1 et *mink*. La majorité de ces sous-unités ($Ca_v3.1$, $Ca_v\alpha2\delta2$, $Kv\beta3$, $Na_v\beta1$ et Kir3.1) a une expression transcriptionnelle préférentielle dans le nœud sinusal par rapport au ventricule, suggérant donc le rôle majoritairement nodal de ces protéines (Marionneau *et al.*, 2005). Basé sur cette hypothèse, les conséquences fonctionnelles des modifications d'expression de ces gènes dans le ventricule sont difficiles à envisager. Il est donc tentant de penser que ces modulations d'expression puissent correspondre à un effet direct de l'ivabradine plutôt qu'à une adaptation moléculaire à la bradycardie. En particulier, il pourrait être intéressant d'étudier plus précisément les modifications d'expression des gènes codant pour les sous-unités $Ca_v3.1$ ou Kir3.1 en réponse à l'ivabradine afin de déterminer s'il s'agit d'un effet thérapeutique de la molécule dans l'induction ou le maintien de la bradycardie. Il est important de noter ici que cette dernière hypothèse confirme malgré tout la spécificité de l'ivabradine envers la fonction du nœud sinusal, comme précédemment décrit (Thollon *et al.*, 1994 ; Gardiner *et al.*, 1995 ; Simon *et al.*, 1995).

Ce résultat semblait donc écarter le rôle d'une bradycardie modérée dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques dans le ventricule, au moins dans notre modèle. Nous pouvons donc en conclure que les modifications d'expression associées au traitement par l'amiodarone chez la souris (Le Bouter *et al.*, 2004) ne sont certainement pas liées à la diminution du rythme cardiaque induite par le traitement. En effet, les 6 gènes dont l'expression est modifiée dans le ventricule des souris traitées par l'ivabradine ne sont pas modulés de la même façon dans le ventricule des souris traitées par

l'amiodarone. D'une façon plus générale, cette étude semble exclure la participation d'un remodelage ionique ventriculaire dans le contexte d'un traitement bradycardisant par l'ivabradine. La pertinence de ce résultat doit cependant être considérée avec prudence pour la simple raison que le modèle expérimental utilisé ne présente pas de pathologie sous-jacente. La participation d'un remodelage ionique dans un contexte pathologique n'est effectivement pas à exclure.

La réalisation d'une étude cinétique du remodelage ionique pourrait permettre de savoir si le remodelage intervient de façon précoce au cours du traitement ou s'il correspond à un effet thérapeutique de la molécule dans l'induction et le maintien d'une bradycardie modérée et stable. De plus, l'évaluation d'un possible effet rebond à l'arrêt du traitement, dû notamment à la sur-expression des canaux HCN, pourrait nous aider à mieux interpréter ces résultats. Enfin, seule la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres modèles de bradycardie modérée, comme par exemple des modèles transgéniques pourrait nous permettre de corrélérer le remodelage ionique observé à une adaptation moléculaire au ralentissement de la fréquence cardiaque.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Depuis la découverte du système de conduction ventriculaire en 1839 et du nœud sinusal en 1907, des progrès considérables ont été réalisés dans le décryptage des mécanismes à l'origine de l'automatisme cardiaque (Silverman *et al.*, 2006). Et ces dernières années, les modèles murins ont contribué largement à faire progresser la connaissance des déterminants moléculaires de l'automatisme et de la conduction de l'influx électrique dans le cœur de mammifère. Les modèles murins sont à la fois utiles sur le plan mécanistique, pour décoder les mécanismes physiologiques mais ils constituent aussi parfois des modèles pertinents de pathologies cardiaques humaines.

En l'état des connaissances en anatomie et physiologie cardiaque de la souris, les modèles murins ont longtemps étaient considérés comme peu pertinents pour certaines pathologies cardiaques comme par exemple la fibrillation atriale ou ventriculaire. Selon certains, la très petite taille du cœur de la souris ne lui permettait pas de fibriller. Cependant des études récentes ont mis en évidence des épisodes de fibrillation atriale et ventriculaire chez la souris, écartant cette hypothèse (Royer *et al.*, 2005 ; Temple *et al.*, 2005 ; Vaidya *et al.*, 1999 ; Wakimoto *et al.*, 2001). Pour la première fois, chez la souris vigile nous avons enregistré au sein du laboratoire des épisodes de Torsades de pointe dans un modèle murin de bloc AV (Figure 38).

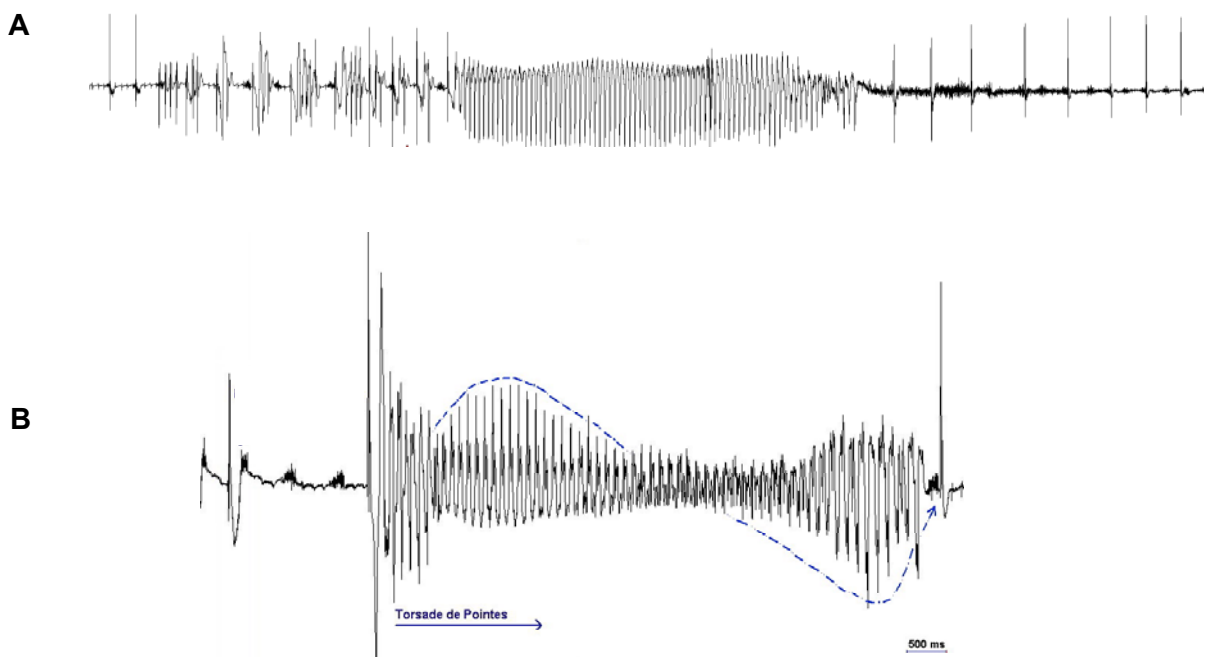


Figure 38 : Tachycardie ventriculaire (A) et épisode de Torsade de pointe (B) chez la souris vigile. Données non publiées du laboratoire.

Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans ce manuscrit, les modèles murins transgéniques peuvent être générés sur différents fonds génétiques qui peuvent d'ailleurs faciliter ou masquer le phénotype attendu. Pour des études mécanistiques, il est sûrement préférable d'utiliser des animaux possédant un patrimoine génétique à fort niveau d'homologie et donc travailler sur des souris consanguines ayant été croisées ensemble sur au moins 8 générations ("back-cross"). Par contre, lorsque l'on cherche à obtenir un modèle murin d'une pathologie monogénique, il est peut être préférable de travailler sur des animaux possédant l'inactivation du gène ou l'expression de la mutation d'intérêt, sans pour autant être sur un fond génétique considéré comme stable. En effet, cela devrait permettre d'évaluer la variabilité du phénotype et de se trouver dans des conditions d'étude plus proches de celles rencontrées chez l'homme. Il est toutefois important de moduler ce propos, à la lumière des résultats que nous avons obtenus sur les souris *Scn5a*^{+/-}. Ce modèle a été produit sur un fond génétique du type 129Sv, et le nombre de croisements entre générations excède les 8 nécessaires pour considérer que nous avons un fort niveau d'homologie génétique entre les individus de la lignée. Toutefois, comme le montre notre étude sur l'hétérogénéité phénotypique dans ce modèle (article 3, page 112), il est probable qu'une certaine variabilité subsiste ou que des facteurs environnementaux ou individuels (âge, sexe, tonus sympatho-vagal) soient primordiaux dans la détermination du phénotype (Käab & Schulze-Bahr, 2005). La génétique ne détermine pas tout.

Certes les modèles murins ont permis d'enrichir la connaissance des déterminants de l'automatisme cardiaque, mais depuis quelques années, ce sont les modèles mathématiques qui se révèlent également fort utiles. Ils ont été élaborés à partir de données expérimentales obtenues dans différentes espèces, principalement la souris et le lapin. Depuis les premiers modèles ne prenant en compte que les courants ioniques, ils ont été enrichis au fur et à mesure pour rendre compte de l'homéostasie calcique, de la régulation par le système nerveux autonome et de l'hétérogénéité cellulaire du nœud sinusal (Noble, 1962 ; Wilders *et al.*, 1991 ; Demir *et al.*, 1994 ; Maltsev *et al.*, 2006 ; Dokos *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 2000). La modélisation mathématique des potentiels d'action sinusaux peut s'avérer utile pour prédire les effets d'une mutation ou de l'inactivation d'un gène codant des canaux ioniques, ou encore évaluer les effets d'un médicament sur l'activité *pacemaker*. Ces modèles pourront être utiles à l'avenir pour découvrir et développer de nouveaux agents thérapeutiques (Noble, 2003).

La connaissance des déterminants moléculaires de l'automatisme cardiaque autorise aujourd'hui le développement de thérapeutiques pharmacologiques ou géniques ciblées. En effet, depuis quelques années, certains laboratoires cherchent à créer des *pacemaker*

biologiques qui pourraient remplacer ou du moins soutenir les stimulateurs électroniques. Le net avantage d'une thérapie cellulaire ou génique en remplacement des stimulateurs électroniques réside dans leur possible régulation par le système nerveux autonome (Rosen *et al.*, 2004). Les gènes codant les canaux *pacemaker* HCN font partie des gènes utilisés par plusieurs laboratoires en thérapie génique pour rétablir ou accélérer l'automatisme cardiaque (Robinson *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons détaillé dans ce manuscrit, les canaux HCN sont aussi la cible de nouveaux agents bradycardisants spécifiques. L'ivabradine (Procoralan®), inhibiteur de ces canaux est le premier à avoir obtenu au cours de cette année l'autorisation de mise sur le marché en Europe dans le traitement de l'angor stable. Par ailleurs, notre démonstration de l'implication des canaux calciques de type T dans l'automatisme et la conduction de l'influx électrique cardiaque ouvre la porte au développement d'inhibiteurs sélectifs des canaux $Ca_v3.1$ dans le traitement de l'infarctus du myocarde ou de la maladie coronaire aiguë. En effet, dans ces deux pathologies, un ralentissement modéré de la fréquence cardiaque est recherché. De plus, les inhibiteurs sélectifs de canaux calciques de type T pourraient être intéressants pour traiter la fibrillation auriculaire (Fareh *et al.*, 1999 ; Fareh *et al.*, 2001). Le mibéfradil, un bloqueur sélectif de ces canaux permet en effet de prévenir le remodelage électrique induit par stimulation atriale rapide conduisant à la fibrillation auriculaire chez le chien. Il allonge la durée de cycle et la période réfractaire effective atriale (Fareh *et al.*, 1999).

La dernière étude présentée dans ce manuscrit met en évidence l'intérêt de la souris en pharmacologie. Comme chez les plus gros mammifères, des études cardiovasculaires chez l'animal vigile sont réalisables et des données pharmacocinétiques peuvent être obtenues afin de corrélérer l'effet observé avec les taux plasmatiques. Par ailleurs, la connaissance du génome dans cette espèce nous permet de l'utiliser pour évaluer les effets transcriptionnels d'un médicament, et de révéler ainsi les effets moléculaires directs ou indirects d'un traitement pharmacologique. Ce type d'approche permet de mettre en évidence la spécificité d'action d'une molécule, comme en atteste la nette augmentation de l'expression des cibles moléculaires de l'ivabradine (HCN2 et HCN4) et les faibles modifications d'expression observées dans le tissu ventriculaire (article 4, page 122).

Des modèles murins pathologiques commencent à être utilisés pour valider des traitements pharmacologiques de pathologies rythmiques cardiaques. C'est par exemple le cas de modèles murins du syndrome du QT long. La méxilétiline, un inhibiteur sodique réduit par exemple la survenue des troubles du rythme ventriculaire dans un modèle du syndrome du QT long de type 3, associé à une mutation gain de fonction du canal sodique $Na_v1.5$ (Fabritz *et al.*, 2003). La nifédipine, un inhibiteur calcique, réduit quant à elle les troubles du

rythme ventriculaire associés aux mutations perte de fonction du gène KCNE1, rencontrées dans le syndrome du QT long de type 5 (Balasubramaniam *et al.*, 2003). Enfin, la bédipine, un autre inhibiteur calcique inhibe le remodelage cardiaque associée à l'hypertrophie par surcharge de pression dans un modèle de souris (Liao *et al.*, 2005). Elle restaure en partie la fonction contractile ventriculaire et diminue la fibrose myocardique.

Dans ce contexte, nous prévoyons d'utiliser notre modèle de la maladie de Lenègre, les souris Scn5a^{+/-} pour tester différentes molécules ayant des propriétés anti-fibrotiques, comme par exemple les inhibiteurs de système rénine-angiotensine-aldostérone. Nous pourrions utiliser des inhibiteurs de l'enzyme de conversion, des inhibiteurs de l'angiotensine II ou encore des inhibiteurs de l'aldostérone (Boccanelli & Battagliese, 2006 ; Lahera *et al.*, 2006 ; Zannad & Radauceanu, 2005).

Enfin, il nous faut rester prudent lors de l'extrapolation chez l'homme de toutes les données obtenues chez l'animal que ce soit moléculaires ou pharmacologiques. A ce jour, la séquence d'activation du nœud sinusal et du nœud AV, l'expression des canaux ioniques et l'hétérogénéité régionale de ces structures sont inconnues chez l'homme. Il faudra un jour pouvoir étudier ces structures afin de confirmer les hypothèses avancées grâce aux modèles animaux en physiopathologie des dysfonctions sinusales et des troubles de la conduction AV.

Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Mouse Model of SCN5A-Linked Hereditary Lenègre's Disease: Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis

Anne Royer, Toon A.B. van Veen, Sabrina Le Bouter, Céline Marionneau, Violaine Griol-Charhbili, Anne-Laure Léoni, Marja Steenman, Harold V.M. van Rijen, Sophie Demolombe, Catharine A. Goddard, Christine Richer, Brigitte Escoubet, Thérèse Jarry-Guichard, William H. Colledge, Daniel Gros, Jacques M.T. de Bakker, Andrew A. Grace, Denis Escande and Flavien Charpentier

Circulation 2005;111;1738-1746; originally published online Apr 4, 2005;

DOI: 10.1161/01.CIR.0000160853.19867.61

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2005 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/111/14/1738>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone 410-5280-4050. Fax: 410-528-8550. Email:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/static/html/reprints.html>

Mouse Model of *SCN5A*-Linked Hereditary Lenègre's Disease

Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis

Anne Royer, PhD*; Toon A.B. van Veen, PhD*; Sabrina Le Bouter, PhD; Céline Marionneau, MSc; Violaine Griol-Charhbil, MSc; Anne-Laure Léoni, DVM; Marja Steenman, PhD; Harold V.M. van Rijen, PhD; Sophie Demolombe, PhD; Catharine A. Goddard, PhD; Christine Richer, PharmD, PhD; Brigitte Escoubet, MD, PhD; Thérèse Jarry-Guichard, PhD; William H. Colledge, PhD; Daniel Gros, PhD; Jacques M.T. de Bakker, PhD; Andrew A. Grace, PhD, FRCP; Denis Escande, MD, PhD; Flavien Charpentier, PhD

Background—We have previously linked hereditary progressive cardiac conduction defect (hereditary Lenègre's disease) to a loss-of-function mutation in the gene encoding the main cardiac Na⁺ channel, *SCN5A*. In the present study, we investigated heterozygous *Scn5a*-knockout mice (*Scn5a*^{+/-} mice) as a model for hereditary Lenègre's disease.

Methods and Results—In *Scn5a*^{+/-} mice, surface ECG recordings showed age-related lengthening of the P-wave and PR- and QRS-interval duration, coinciding with previous observations in patients with Lenègre's disease. Old but not young *Scn5a*^{+/-} mice showed extensive fibrosis of their ventricular myocardium, a feature not seen in wild-type animals. In old *Scn5a*^{+/-} mice, fibrosis was accompanied by heterogeneous expression of connexin 43 and upregulation of hypertrophic markers, including β -MHC and skeletal α -actin. Global connexin 43 expression as assessed with Western blots was similar to wild-type mice. Decreased connexin 40 expression was seen in the atria. Using pangenomic microarrays and real-time PCR, we identified in *Scn5a*^{+/-} mice an age-related upregulation of genes encoding Atf3 and Egr1 transcription factors. Echocardiography and hemodynamic investigations demonstrated conserved cardiac function with aging and lack of ventricular hypertrophy.

Conclusions—We conclude that *Scn5a*^{+/-} mice convincingly recapitulate the Lenègre's disease phenotype, including progressive impairment with aging of atrial and ventricular conduction associated with myocardial rearrangements and fibrosis. Our work provides the first demonstration that a monogenic ion channel defect can progressively lead to myocardial structural anomalies. (*Circulation*. 2005;111:1738-1746.)

Key Words: conduction ■ ion channels ■ remodeling

Idiopathic progressive cardiac conduction disease, also known as Lenègre or Lev's disease, is characterized by an age-related alteration in the conduction of the cardiac impulse that can ultimately lead to chronic atrioventricular block, justifying pacemaker implantation. Since the initial Lenègre and Lev's description,^{1,2} it was considered a primary degenerative disease affecting the conducting network. In 1999, some of us identified a splicing mutation in the *SCN5A* gene in a French family, resulting in nonfunctional cardiac sodium channels and leading to hereditary Lenègre disease.³ Interestingly, although the haploinsufficiency was already present

during infancy in the mutation carriers, the cardiac conduction defect worsened progressively with age, leading to life-threatening conduction blocks only in the older patients.⁴ It was therefore likely that a combination between the *SCN5A* mutation and additional degenerative abnormalities in relation with aging explains the progressive alteration of the conduction velocity in hereditary Lenègre patients.

Most recently, a mouse model with targeted disruption of the *Scn5a* gene has been established.⁵ Homozygous mice died before birth, whereas heterozygous (*Scn5a*^{+/-}) mice survived and demonstrated conduction slowing qualitatively similar to

Received September 21, 2004; revision received November 30, 2004; accepted December 1, 2004.

From l'Institut du Thorax, INSERM U533 (A.R., S.L.B., C.M., A.-L.L., M.S., S.D., D.E., F.C.), Faculté de Médecine, Nantes, France; the Department of Medical Physiology (T.A.B.v.V., H.V.M.v.R.), University Medical Center, Utrecht, the Netherlands; the Experimental and Molecular Cardiology Group (J.M.T.d.B.), Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; the Section of Cardiovascular Biology (C.A.G., W.H.C., A.A.G.), Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Cambridge, UK; the Département de Pharmacologie (V.G.-C., C.R.), Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; INSERM U426, CEF IFR02 (B.E.), Université Paris 7, Paris, France; and CNRS UMR 6545, Institut de Biologie du Développement de Marseille (T.J.-G., D.G.), Université de la Méditerranée, Marseille, France.

*The first 2 authors contributed equally to this work.

Correspondence to Flavien Charpentier, PhD, INSERM U533, Institut du Thorax, Faculté de Médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex, France. E-mail flavien.charpentier@nantes.inserm.fr

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000160853.19867.61

that seen in inherited Lenègre patients. We thus decided to explore whether the *Scn5a*^{+/-} mice undergo age-related changes in their cardiac phenotype, as do Lenègre patients. We found that the conduction defect in *Scn5a*^{+/-} mice increases progressively with age and that this progression is associated with a pronounced myocardial rearrangement, including fibrosis and expression of hypertrophy markers but a conserved contractile function. Our data provide the first univocal demonstration that a monogenic ion channel defect can lead, with aging, to myocardial structural anomalies. Finally, by making use of a genetically engineered animal model, our results further support the original Lenègre and Lev's hypothesis suspecting a fibrotic process as being responsible for slowly progressing conduction defects.

Methods

Scn5a^{+/-} mice with 129/Sv genetic background were generated at the University of Cambridge (Cambridge, UK) and bred either at this institution or at l'Institut du Thorax (Nantes, France) and were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as previously described.⁵ Because ECG studies revealed no phenotypic difference between the 2 sources of mice, data were pooled. The study conformed with the institutional guidelines for animal use in research. All experiments were performed on age-matched wild-type (WT) and heterozygous littermates.

Electrocardiography

Three-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.7, EMKA Technologies). Recordings were filtered between 0.5 and 250 Hz. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of etomidate (15 mg/kg). Body temperature was maintained at 37°C by use of a thermally controlled heating pad (Harvard Apparatus). Criteria used for measuring RR, PR, QT_r, and QT intervals (Figure 1), as well as P-wave duration, have been reported previously.⁶ QT intervals were corrected for heart rate by use of the formula: corrected QT-interval duration (QT_c) = QT/(RR/100)^{1/2}, with QT and RR measured in milliseconds.⁷ The QRS interval was measured from the beginning of the Q wave to the cross-point between the isoelectric line and the ST_r segment (Figure 1).

Echocardiography

Echocardiography was performed with a Toshiba Powervision 6000, SSA 370A device equipped with an 8- to 14-MHz linear transducer under isoflurane anesthesia (0.75% to 1.0% in oxygen) and spontaneous ventilation. Data were transferred to a computer for offline analysis (Ultrasound Image Workstation-300A, Toshiba). The left ventricle (LV) was imaged in parasternal long axis view for left atrium and LV measurement (end-diastolic diameter, ejection fraction, and shortening fraction) in time-motion mode. Pulse-wave Doppler tissue imaging was obtained from the posterior wall for the measurement of maximal wall velocities (systolic wave). The apical view was used for posterior wall Doppler measurement of LV mitral inflow (E wave) and LV aortic outflow (ejection time), as well as for tissue Doppler measurement of mitral annulus velocities (systolic wave and diastolic wave).

Hemodynamics in Anesthetized Mice

Animals were anesthetized with intraperitoneal sodium pentobarbital (60 to 100 mg/kg), and the trachea was intubated to facilitate breathing. Body temperature was maintained at 37°C. The left jugular vein and the right carotid artery were isolated. A catheter tip pressure transducer (Mikrotip 1.4F, Millar Instruments) was inserted into the right carotid artery and advanced to the LV under guidance of the pressure signal and fixed in position. Blood pressure, heart rate, LV pressure, and maximal positive (+dP/dt) and maximal

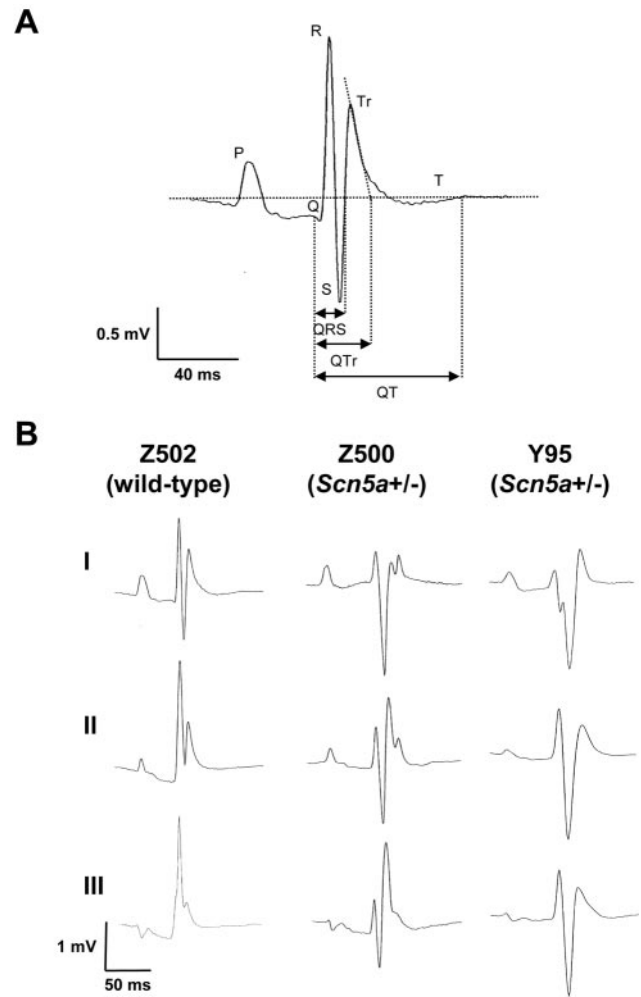


Figure 1. Surface ECGs in WT and *Scn5a*^{+/-} mice. A, Method for measuring QRS, QT_r, and QT intervals on mouse recordings (lead I). B, Representative ECG recordings (leads I, II, and III) in a WT and 2 different *Scn5a*^{+/-} mice.

negative (−dP/dt) rates of pressure development were monitored for 10 minutes under basal conditions and during isoproterenol infusion (0.3 μg/mL at 1 μL · g⁻¹ · min⁻¹, Abbott) on a computer with an MP100 system (Biopac Systems, Cerom).

Real-Time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from 2 μg of cardiac total RNA samples by use of high-capacity cDNA Archive Kit for reverse transcription (RT)-PCR (Applied Biosystems). Online PCR was performed with predesigned FAM-labeled fluorogenic TaqMan probes and primers and 1XTaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). After 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, 40 cycles of amplification were performed, each at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were collected with instrument-spectral compensation by the Applied Biosystems SDS 2.1 software. The fluorescence signals were normalized to the ubiquitously expressed housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). The comparative threshold cycle relative quantification method⁸ was used to compare the amounts of mRNA in WT and transgenic mice. Each plate contained duplicate quantification for each gene.

Microarray Hybridization

Cy3- and Cy5-labeled cDNA was prepared from polyA⁺ RNA samples by use of the CyScribe cDNA Post Labeling Kit (Amersham

TABLE 1. ECG Characteristics of Wild-Type (n=85) and Heterozygous (*Scn5a*^{+/-}; n=106) Mice

	M/F	RR, ms	P, ms	PR, ms	QRS, ms	QTc	QTc	(QTc-QRS)c	(QTc-QRS)c
Wild type	50/35	159±3	18±1	41±1	16±1	27±1	52±1	13±1	39±1
<i>Scn5a</i> ^{+/-}	60/46	170±2	21±1	45±1	24±1	30±1	58±1	11±1	40±1
<i>P</i> value vs wild type	NS	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	NS	NS

M/F indicates male/female ratio; RR, RR interval duration; P, P-wave duration; PR, PR-interval duration; QRS, QRS-complex duration; QTc, corrected QT interval duration; and NS, not significant.

The age of wild-type and *Scn5a*^{+/-} mice ranged from 3 to 71 weeks, with average values of 18±2 and 21±2 weeks, respectively.

Data are expressed as mean±SEM.

Pharmacia Biotech). Labeled samples were hybridized onto 2 MWG Mouse 10k Arrays according to the protocol provided by the manufacturer (MWG Biotech). Data were extracted as described previously.⁹ Genes with Cy5/Cy3 expression ratios >1.5 or <0.67 in both 10k A or in both 10k B hybridizations were defined as differentially expressed.

Immunohistochemistry and Histology

After excision, hearts were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For each group (young versus old and WT versus heterozygous), 5 hearts were serially sectioned to generate sections of 10-μm thickness. Sections taken from different levels were incubated with antibodies as reported previously.¹⁰ After immunolabeling, sections were mounted in Vectashield (Vector Laboratories) and examined by use of a classic light microscope with epifluorescence equipment (Nikon Optiphot-2). To evaluate the presence of fibrosis, sections were fixed with 4% paraformaldehyde (in PBS, 30 minutes at room temperature) and stained with picrosirius red.¹¹ Serial sections were stained with hematoxylin-eosin and analyzed with routine light microscopy.

Protein Isolation, SDS-PAGE, and Western Blotting

Western blot experiments were performed with methods described previously.^{10,12} For the experiments comparing young (14 to 16 weeks old) and old (50 to 73 weeks old) mice, total cellular protein was isolated from 5 hearts (total ventricular section) in each group (young versus old and WT versus *Scn5a*^{+/-}) as described previously.¹⁰ Protein content of the supernatant was assessed according to Lowry's method. Equal amounts (30 μg/lane) of each sample were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred by electrophoresis to nitrocellulose membrane (Biorad). Equality of protein transfer was assessed by Ponceau S staining. After first and secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody incubations, signals were visualized by use of an enhanced chemoluminescence reagent (Amersham) and exposure to XB-1 film (Kodak).

Antibodies

The following antibodies were used: mouse monoclonal antibodies against connexin43 (Cx43; Transduction Laboratories), α-actinin (Sigma Aldrich), β-myosin heavy chain (β-MHC, kindly provided by Dr A.F.M. Moorman, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands) and desmin (Sigma Aldrich); rabbit polyclonal antibodies against Cx43 or connexin40 (Cx40),¹² N-cadherin (Sigma Aldrich), and skeletal α-actin (α-SKA, kindly provided by Dr S. Clement, University of Geneva, Switzerland). Secondary antibodies (Texas Red- and FITC-conjugated whole IgG) were purchased from Jackson Laboratories.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed with a Fisher exact test, Student *t* test, and 1- or 2-way ANOVA completed by a Tukey test when appropriate. A value of *P*<0.05 was considered significant.

Results

Age-Related Progressive Development of the Conduction Defect in *Scn5a*^{+/-} Mice

Figure 1B shows representative ECG recordings from a WT and 2 *Scn5a*^{+/-} mice. Prolonged P-wave, PR-interval, and QRS interval durations (see Table 1 for average values from all mice studied) characterized *Scn5a*^{+/-} mice. *Scn5a*^{+/-} mice also showed slight but significant bradycardia, which was further confirmed by telemetry recordings (not illustrated). Figure 1B also shows that *Scn5a*^{+/-} mice had a rightward shift in their cardiac axis. In contrast, the ventricular repolarization per se was not affected, because the observed prolongation in QTc and QTc intervals was caused by prolongation of the QRS interval (Table 1).

As shown in Figure 2, P-wave, PR, and QRS intervals progressively prolonged with aging (from 3 to 71 weeks; *P*<0.001 for all parameters). At every age range, these parameters were larger in *Scn5a*^{+/-} than in WT mice (*P*<0.001 for all parameters). At the ventricular level, the progressive increase in QRS interval with aging was slightly although significantly more pronounced in *Scn5a*^{+/-} than in WT mice. Indeed, the QRS/age slope was steeper in *Scn5a*^{+/-} (0.14±0.02 ms/wk) than in WT animals (0.08±0.02 ms/wk; *P*<0.05). The observed age-related prolongation in conduction times coincided perfectly with our previous measurements in patients with genetically acquired Lenègre's disease (see Figure 5 in Reference 4).

Age-Related Fibrosis in the Ventricular Myocardium of *Scn5a*^{+/-} Mice

Ventricular sections stained with picrosirius red were evaluated for the presence of fibrosis in young (14 to 16 weeks) and old (50 to 73 weeks) animals. Young mice, either WT or heterozygous, did not show fibrosis, with the exception of normal interstitial collagen between the muscle fibers (Figure 3A). The same pattern was found in old WT mice. In contrast, fibrosis in old *Scn5a*^{+/-} mice was abundant and was found both in the left and right ventricular free walls and in the interventricular septum. The pattern of observed fibrosis was heterogeneous, with multiple spots of different sizes surrounded by healthy nonfibrotic myocardium. Typical examples of ventricular replacement fibrosis in old *Scn5a*^{+/-} hearts are shown in Figure 3B. Both in the LV free wall and in the interventricular septum, staining of serial sections with hematoxylin shows that the fibrotic tissue was intermingled and surrounded by healthy myocardial bundles. Surprisingly, although in young *Scn5a*^{+/-} mice, no fibrosis was observed in the ventricular working

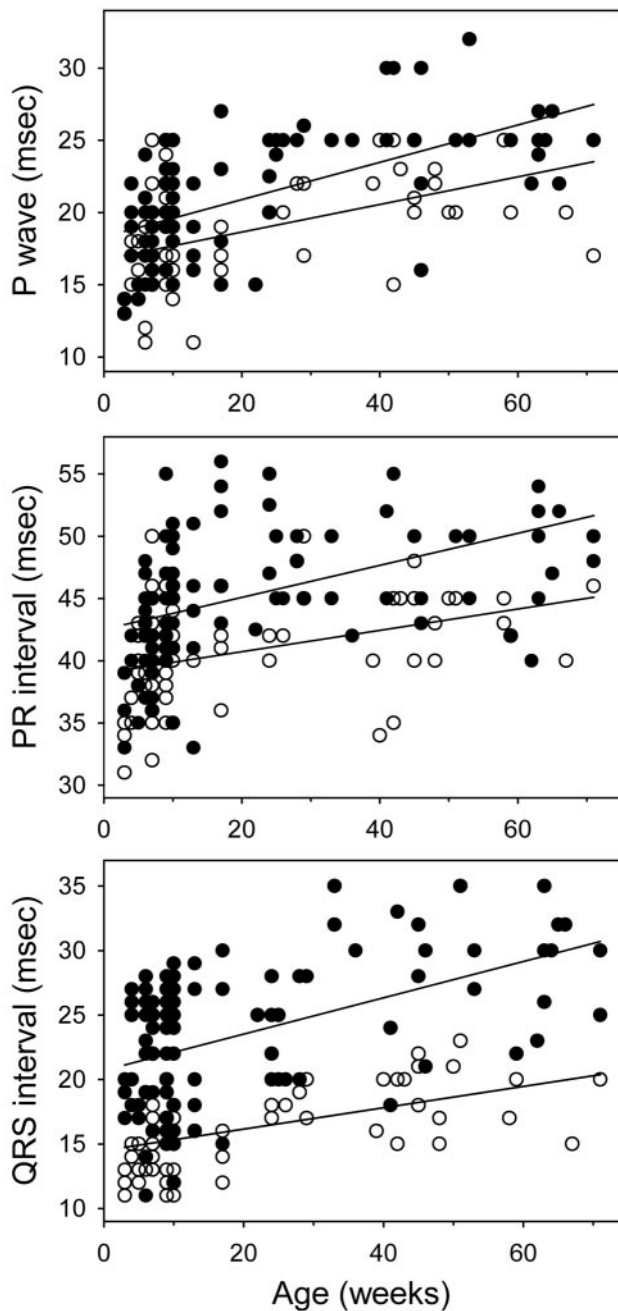


Figure 2. Effects of age (x axis) on P-wave duration (y axis; top), PR interval duration (y axis; middle), and QRS interval duration (y axis; bottom) in WT (open symbols; n=106) and *Scn5a*^{+/-} (filled symbols; n=85) mice.

myocardium, increased perivascular fibrosis could be detected, an anomaly not seen in young WT hearts (Figure 3C, left side). With aging, perivascular fibrosis became massive in *Scn5a*^{+/-} mice (Figure 3C, right side). In areas of ventricular working myocardium where no fibrosis was detected (Figure 3D, area 1), a uniform expression pattern of the gap junction protein Cx43 was observed. In contrast, in areas of replacement fibrosis (Figure 3D, area 2), the uniform distribution was completely disturbed, because Cx43 could hardly be detected between myocytes within the scar, whereas its expression in the directly surrounding viable myocytes was irregular.

Expression of Hypertrophic Markers in the Aged *Scn5a*^{+/-} Myocardium

Immunolabeling with antibodies against the hypertrophic markers β -MHC and skeletal α -actin was used to evaluate the status of the ventricular myocardium (Figure 4A). The expression of these structural proteins is very low in the healthy mouse heart but is upregulated in myopathological conditions. In the heart of young WT mice, rare areas with immunopositive cells were found. The amount of positive areas and the intensity of labeling were slightly increased in young *Scn5a*^{+/-} mice. In contrast, a large increase in immunolabeled cells was observed in the myocardium of old *Scn5a*^{+/-} animals. Western blots incubated with antibodies against skeletal α -actin confirmed this increased expression (Figure 4B). Antibodies against β -MHC were found to be ineffective on Western blot. Figure 4 also shows the expression level of α -actinin. This protein of the contractile machinery is expressed primarily in the normal myocardium. In young animals, α -actinin was equally expressed in the ventricle of WT and *Scn5a*^{+/-} animals. In old mice, however, α -actinin was expressed at a substantially higher level in the *Scn5a*^{+/-} hearts. At the mRNA level, real-time RT-PCR experiments confirmed the age-dependent increase in β -MHC and skeletal α -actin expression in *Scn5a*^{+/-} mice. Whereas β -MHC expression was normal in 10-week-old *Scn5a*^{+/-} mice ($0 \pm 7\%$ versus WT; n=12), it was upregulated by $46 \pm 15\%$ and $70 \pm 21\%$ in 21-week-old (n=12) and 56- to 60-week-old (n=12) animals, respectively. Similar observations were obtained with skeletal α -actin. In contrast, the expression of troponin I mRNA was unaltered.

We used mouse pangenomic microarrays (20 000 oligonucleotides) to characterize further the cardiac gene expression remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice. For this, two 11-month-old *Scn5a*^{+/-} mice were compared with 2 age-matched WT mice. The list of genes differentially expressed in *Scn5a*^{+/-} mice (as defined in the Methods section) can be found at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>. Among the genes found to be upregulated, 2 were of particular interest and were characterized further with real-time RT-PCR: the early growth response 1 (*Egr1*) and activating transcription factor 3 (*Atf3*) genes (Figure 4C). The expression of both transcription factors was comparable in WT and *Scn5a*^{+/-} young (10-week-old) animals but consistently increased with aging in *Scn5a*^{+/-} mice.

Remodeling of Gap Junction Protein Expression

Western blot experiments indicated that the expression of Cx43 protein in the ventricles or atria of both 30- to 40-week-old WT and *Scn5a*^{+/-} mice was similar (Figure 5A). In contrast, the expression of Cx40 was reduced by approximately 50% in the atria of *Scn5a*^{+/-} compared with WT mice. We observed that the regional distribution of Cx43 in the ventricle of *Scn5a*^{+/-} old animals was markedly disturbed because of heterogeneously located patches of fibrosis (see Figure 3D). Further Western blots were thus performed in young (14- to 16-week-old) and old (50- to 73-week-old) mice with a different antibody. Results confirmed that the ventricular expression of Cx43 was similar in both WT and *Scn5a*^{+/-} mice, even in older animals (Figure 5B). We

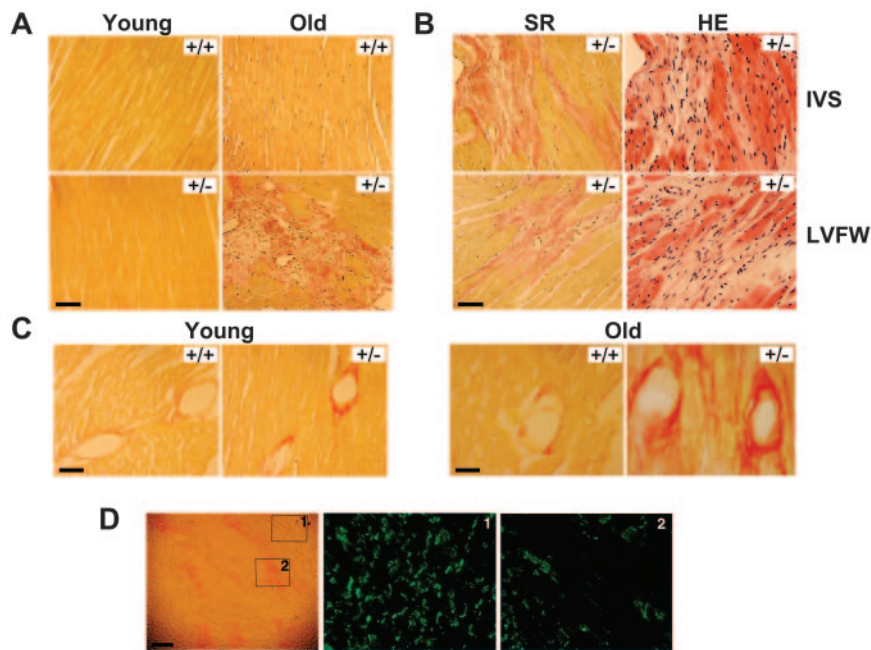


Figure 3. Histological sections of ventricular myocardium. A, Sirius red staining of LV from young (14 to 16 weeks; left) and old (right) WT (+/+) and *Scn5a*^{+/-} (+/-) mice. Fibrosis appears in red, healthy tissue in yellow. Bar=50 μ m. B, Fibrosis in old *Scn5a*^{+/-} mice. Sirius red (SR; left) and hematoxylin-eosin (HE, right) staining of serial slices taken from interventricular septum (top) and LV free wall (bottom). Bar=50 μ m. C, Vascular fibrosis in young (left) and old (right) mice. Bar=50 μ m at left and 25 μ m at right. D, Low-magnification Sirius red staining of LV of an old *Scn5a*^{+/-} mouse showing heterogeneous fibrosis (left). Area 1 shows no fibrosis. Area 2 is fibrotic. Higher magnification of area 1 and 2 immunostained with Connexin43 antibody. Bar=200 μ m at left and 50 μ m in high magnification.

concluded that although the distribution of Cx43 in old *Scn5a*^{+/-} animals was markedly heterogeneous, its global expression was normal. We simultaneously analyzed the expression of N-cadherin, another intercalated disk-related protein. Surprisingly, this component of the adherence junctions was slightly downregulated in young *Scn5a*^{+/-} hearts compared with WT, whereas it was similar in WT and *Scn5a*^{+/-} old hearts (Figure 5B).

Normal Cardiac Function of Old *Scn5a*^{+/-} Mice

Using echocardiography, we assessed the cardiac function in vivo of anesthetized 29- to 30-week-old and 52- to 55-week-old animals. As shown in Table 2, *Scn5a*^{+/-} mice exhibited no sign of altered cardiac function and no ventricular hypertrophy. Heart weight-to-body weight ratios of *Scn5a*^{+/-} mice did not differ from those of WT mice either at the age of 10 weeks (0.49 ± 0.03 versus 0.52 ± 0.01 respectively; $n=8$; $P=NS$) or at 50 to 52 weeks (0.51 ± 0.03 versus 0.52 ± 0.02 ; $n=7$; $P=NS$). Echographic parameters evaluating LV contractility were not different from those of WT mice, including tissue Doppler parameters derived from posterior wall and mitral annulus. Finally, the diastolic LV function was also unaltered (Table 2).

Using Millar catheters, we also evaluated LV pressure, contractility (+dP/dt), and relaxation (-dP/dt). These parameters under baseline conditions were not significantly altered in *Scn5a*^{+/-} mice in comparison with WT (Figure 6). The systolic and diastolic blood pressure were also normal (not shown); however, after intravenous challenge with isoproterenol 0.3 μ g/kg, the contractility was significantly potentialized in WT animals (+dP/dt increased from 2497 ± 323 mm Hg/s to 2973 ± 203 mm Hg/s; $P<0.05$; $n=5$) but not in *Scn5a*^{+/-} mice (2500 ± 140 mm Hg/s versus 2437 ± 182 mm Hg/s; $n=6$). We concluded that the cardiac function of *Scn5a*^{+/-} old animals was close to normal.

Discussion

The present study demonstrates that mice with targeted disruption of the cardiac main Na⁺ channel gene, *Scn5a*, reflect the clinical phenotype of patients with inherited Lenègre's disease, including progressive deterioration of the conduction abnormalities with aging.⁴ Our data also show that this phenotype is caused primarily and mostly by a reduced Na⁺ current and secondarily by an age-related degenerative process comprising gene expression remodeling and fibrosis as a final outcome of the ionic channel defect. Recently, a family with compound heterozygosity for mutations in *SCN5A* was reported to have a severe form of conduction defect early after birth.¹³ Cardiac examination of a patient deceased at the age of 2 years showed ventricular hypertrophy and severe degenerative abnormalities; however, in this family, mutation carriers are expected to have only 5% to 10% of Na current, a situation closer to that of mice with homozygous disruption of *Scn5a*. Defect in another ion channel, the type II ryanodine receptor (RyR2), was also shown to underlie arrhythmogenic right ventricular dysplasia¹⁴; however, the physiology of RyR2 channels is very different from that of *SCN5A*, because RyR2 is an intracellular protein involved in intracellular Ca²⁺ homeostasis.

The configuration of the QRS complex in *Scn5a*^{+/-} mice differs from that of WT mice, suggesting abnormal activation of the heart. Therefore, one explanation to connect a decreased Na⁺ current and myocardial remodeling could be long-term asynchronous electrical activation of the ventricles leading to abnormal cardiac load. Such a phenomenon was previously reported in dogs submitted to LV pacing at physiological rates.¹⁵ In this model, pacing induced asymmetrical hypertrophy probably related to regional differences in the contraction pattern, without changes on global ventricular performance. Interestingly, although the duration of the QRS complex rapidly doubles immediately after initiating the ventricular pacing, this parameter increases by an additional

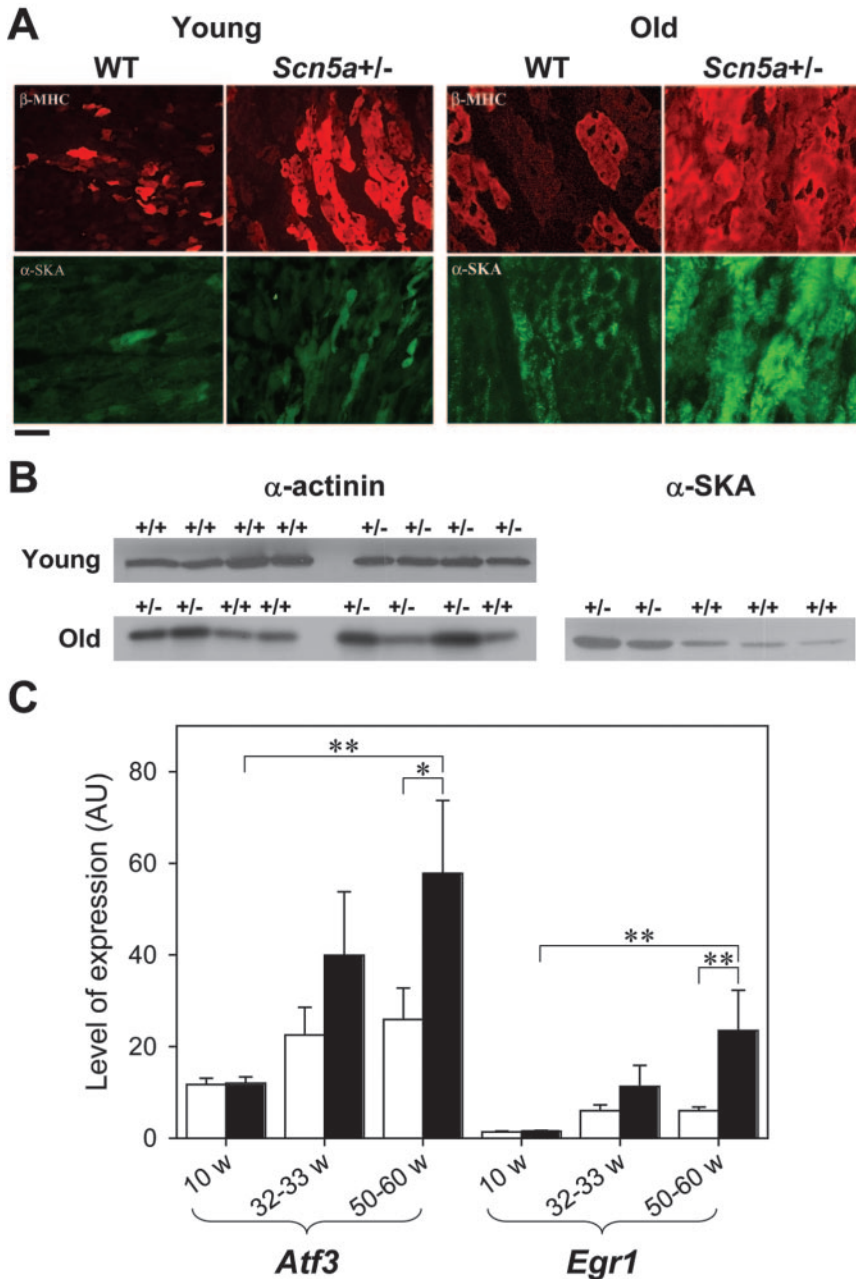


Figure 4. Expression of hypertrophic markers in WT and *Scn5a*^{+/-} ventricles. A, Immunohistochemical labeling of LV sections from young (14 to 16 weeks) and old (50 to 73 weeks) WT and *Scn5a*^{+/-} mice with antibodies against β -MHC (β -MHC; top) and skeletal α -SKA (α -SKA; bottom). Level of expression of α -SKA in young animals was too low for detection. Bar=50 μ m. B, Representative Western blots showing ventricular expression of α -actinin and α -SKA in young and old mice. +/+ is WT; +/- is *Scn5a*^{+/-}. Each well was loaded with same amount of protein (30 μ g; see Methods section for further explanation of loading controls). C, Semiquantitative real-time PCR. Graph represents levels of expression (in arbitrary units) of *Atf3* and *Egr1* genes in WT (open bars) and *Scn5a*^{+/-} (filled bars) mice as a function of age (6-, 26-, and 44- to 52-week-old mice). **P*<0.05; ***P*<0.01.

20% after 6 months. In contrast to mice, no fibrosis is observed in these dogs. This may be because of the relatively brief period of abnormal activation and its late initiation during dog life.

In addition to fibrosis, altered expression of connexins might also participate in abnormal conduction in *Scn5a*^{+/-} mice. In the mouse heart, 3 different connexins form gap junctions.¹⁶ Cx40 is expressed exclusively in the atrium and the specialized conduction system.¹⁷ In *Scn5a*^{+/-} mice, the expression of Cx40 was downregulated in the atria from old mice. Together with decreased Na⁺ current, reduced Cx40 might participate in prolonging the P wave. Prolonged P-wave duration is also a common feature of patients with inherited Lenègre's disease.⁴ The increased PR interval suggested that Cx40 was also downregulated in the conduction system, although technical difficulties prevented measure-

ment of Cx40 expression in this tissue. Expression of Cx43 was not globally modified but rather locally altered in the regions with marked fibrosis, a phenomenon that may decrease conduction velocity locally and increase the heterogeneity of propagation.¹⁰

In the mouse model, myocardial rearrangements occurred concomitantly with overexpression of *Atf3*, a member of the CREB/ATF family of transcription factor genes. *Atf3* is normally expressed at very low levels in the heart but is activated by stressors, such as ischemia-reperfusion. This gene seems to play a detrimental role in the pathogenesis of stress-associated cardiac diseases. Interestingly, overexpression of *ATF3* in the mouse heart was previously shown to increase α -skeletal actin and β -MHC expression and also to induce fibrosis and conduction abnormalities.¹⁸ Because *Atf3* expression increases progressively with age in *Scn5a*^{+/-} mice,

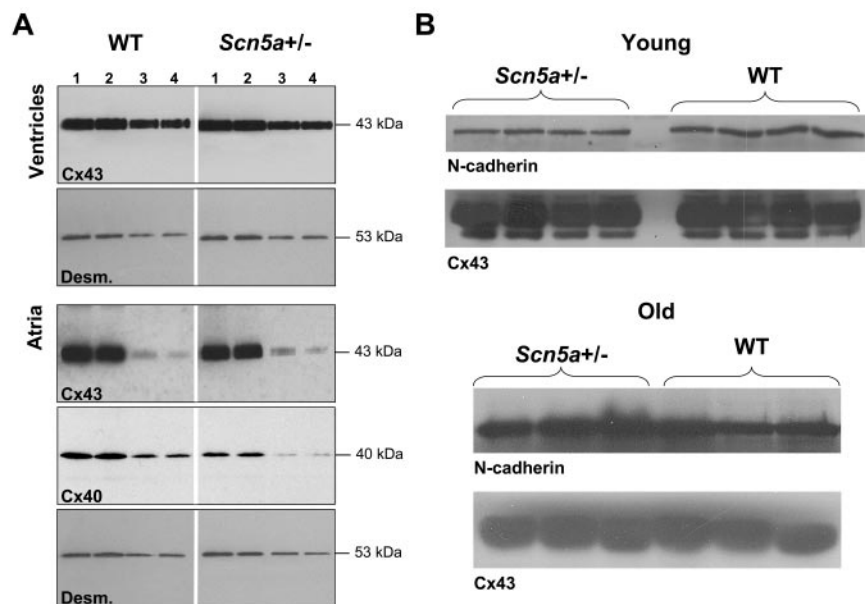


Figure 5. Western blot experiments for connexin 40 (Cx40) and 43 (Cx43) expression. A, Representative blots probed with anti-Cx43 or anti-Cx40 antibodies in ventricular and atrial tissues collected from 36- to 48-week-old WT and *Scn5a*^{+/-} mice. Intensity of signals obtained after treatment with anti-desmin antibody (Desm.) indicated that similar amounts of protein were loaded in wells 1 and 2 (40 μ g) and 3 and 4 (20 μ g). Molecular mass of detected proteins is indicated on right. B, Representative Western blots showing ventricular expression of N-cadherin and Cx43 in young (14 to 16 weeks; top) and old (50 to 73 weeks; bottom) mice. Each well was loaded with same amount of protein (30 μ g; see Methods section for further explanation of loading controls).

it may represent an important trigger for myocardial remodeling. *Egr1*, an early growth response gene, was also associated with the age-related cardiac remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice. *Egr1* may positively regulate the expression of α -skeletal actin and β -MHC, because these proteins are no longer overexpressed during adrenoceptor-induced cardiac

TABLE 2. Mouse Phenotyping With Echocardiography

Genotype	Age			
	31 Weeks		52 Weeks	
	WT (n=6)	<i>Scn5a</i> ^{+/-} (n=7)	WT (n=4)	<i>Scn5a</i> ^{+/-} (n=8)
HR, bpm	547 $\pm$ 13	525 $\pm$ 5	539 $\pm$ 17	544 $\pm$ 7
BW, g	23.7 $\pm$ 0.9	24.4 $\pm$ 1.4	24.3 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 0.5
Remodeling and hypertrophy				
LA, mm	2.65 $\pm$ 0.11	2.42 $\pm$ 0.19	2.35 $\pm$ 0.12	2.42 $\pm$ 0.12
LVEDD, mm	3.94 $\pm$ 0.17	3.38 $\pm$ 0.28	3.99 $\pm$ 0.21	3.60 $\pm$ 0.09
LV/BW, mg/g	4.44 $\pm$ 0.26	4.69 $\pm$ 0.46	3.87 $\pm$ 0.27	3.83 $\pm$ 0.23
LV systolic function				
EF, %	85 $\pm$ 2	84 $\pm$ 3	76 $\pm$ 1	83 $\pm$ 3
VcFc, circ/s	3.09 $\pm$ 0.17	3.32 $\pm$ 0.25	2.77 $\pm$ 0.18	3.53 $\pm$ 0.21
Sa, cm/s	3.01 $\pm$ 0.11	2.96 $\pm$ 0.07	2.46 $\pm$ 0.27	2.49 $\pm$ 0.04
Spw, cm/s	3.22 $\pm$ 0.22	2.99 $\pm$ 0.18	3.04 $\pm$ 0.20	3.03 $\pm$ 0.16
LV diastolic function				
IVRT, ms	15.0 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.8	16.0 $\pm$ 0.7	15.8 $\pm$ 0.5
E/Ea	18.2 $\pm$ 1.1	18.3 $\pm$ 1.0	20.8 $\pm$ 3.8	16.3 $\pm$ 1.0

HR indicates heart rate; BW, body weight; LA, left atrial dimension; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LV/BW, ratio of left ventricular mass to body weight; EF, ejection fraction; VcFc, mean velocity of circumferential fiber shortening corrected for heart rate; Sa, maximal systolic velocity of the mitral annulus; Spw, maximal systolic velocity of the posterior wall; IVRT, isovolumic relaxation time; and E/Ea, ratio of the maximal blood velocity of early LV inflow to the maximal velocity of early diastolic motion of the mitral annulus.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

hypertrophy in *Egr1*-invalidated mice.¹⁹ Obviously, much more work is needed before the role of *Aft3* and *Egr1* in the pathophysiology of *Scn5a* invalidation is clarified. We hypothesize that a 50% reduction in *Scn5a* could create long-term asynchronous electrical activation of the ventricles and abnormal cardiac load. This could alter the expression of regulatory elements such as *Atf3* and *Egr1* and the expression of hypertrophic markers in the absence of patent hypertrophy. This very slow process should ultimately lead to fiber disarray and fibrosis, which would in turn further impair conduction. Future studies will be driven to confirm this sequence.

Other channelopathies, such as the Brugada syndrome, have been associated with loss-of-function mutations in *SCN5A*.²⁰ The Brugada syndrome is usually considered an early repolarization disease, involving disequilibrium between a prominent transient outward current in the right ventricular subepicardium and a decreased Na⁺ current.²¹ Although there is convincing experimental evidence to support this hypothesis, an additional involvement of altered conduction in the pathophysiological sequence leading to this complex disease cannot be excluded.^{22,23} Indeed, the frontier between the Brugada syndrome and progressive conduction diseases remains unclear, because in the same family, the same mutation can induce both diseases.²⁴ Whether the pathophysiology of the Brugada syndrome also involves myocardial fibrosis (either diffuse or localized in the upper right ventricle) remains to be established, particularly for the fraction of Brugada patients carrying a *SCN5A* mutation leading to haploinsufficiency.

In the early descriptions of Lenègre and Moreau¹ and Lev,² excessive fibrosis was found primarily in the conductive tissue. In the mouse model, fibrosis is found primarily in the ventricular working myocardium. Species and heart size differences could very well account for this discrepancy. There are indeed well-known differences in ventricular activation in the mouse compared with larger mammals. In mice,

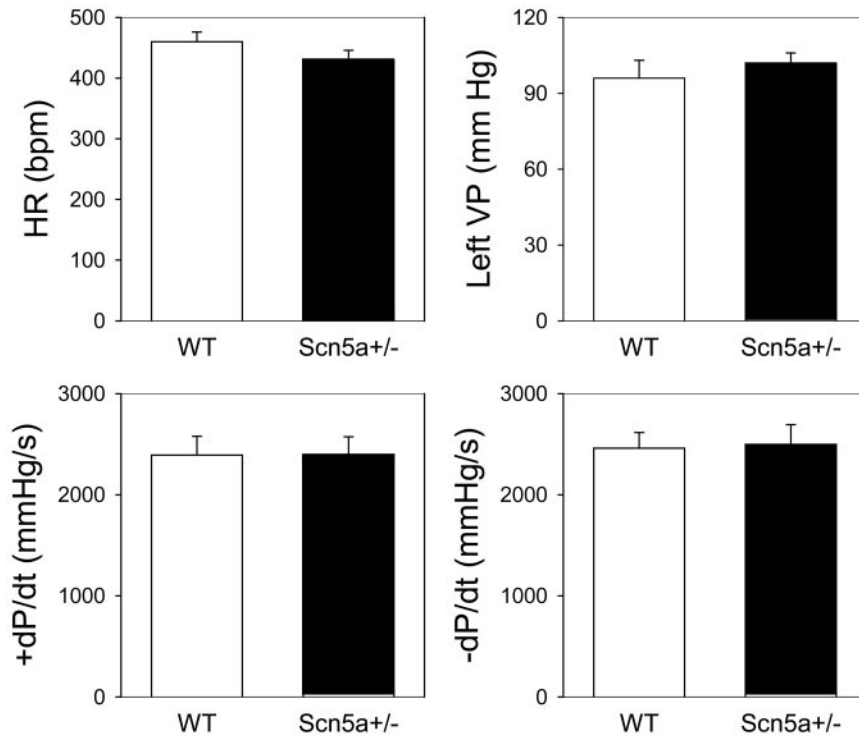


Figure 6. Hemodynamics in *Scn5a*^{+/-} mice. Heart rate (HR), LV systolic pressure (VP), maximal positive rate of LV pressure development (+dP/dt), and maximal negative rate of LV pressure development (-dP/dt) in WT (n=8; open bars) and *Scn5a*^{+/-} (n=7; filled bars) mice.

direct electrical connections are present between the His bundle and upper intraventricular septal regions, whereas the conduction system of larger mammals is electrically insulated from the septal myocardium by a fibrotic sheet.²⁵ Moreover, conduction velocity in the His bundle branches of the mouse is not faster than in the working myocardium.¹² Another major difference between mouse and human is that the mouse heart contracts 10 times more often per time unit than the human heart. Different cardiac sizes lead to different constraints. That abnormal conduction because of a decreased Na⁺ current has slightly different consequences is thus not surprising.

In conclusion, our results obtained in the mouse further support the hypothesis that *SCN5A*-related inherited Lenègre's disease is a result of combined reduced Na⁺ current and an age-related channelopathy-mediated increase in fibrosis. Our findings further support the original Lenègre and Lev hypotheses suspecting a fibrotic process to be responsible for slowly progressing atrioventricular blocks and also provide the first univocal demonstration that a monogenic ion channel defect can lead to progressive myocardial structural anomalies with aging.

Finally, on the basis of our data, we plan to evaluate whether antifibrotic drugs such as ACE inhibitors and/or angiotensin II receptor antagonists would prevent the age-related conduction worsening in our mice. A positive outcome would support a pilot clinical trial in hereditary Lenègre's disease and ultimately in idiopathic progressive cardiac conduction disease.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministère de la Recherche (Action Concertée Incitative Biologie du développement et physiologie intégrative; Dr Charpentier), the Groupement d'Intérêt

Scientifique, Institut des Maladies Rares (Dr Charpentier), the Fondation de France (Dr Escande and Dr Gros), the Netherlands Organization for Scientific Research (Dr van Veen), and the British Heart Foundation and the Medical Research Council (Dr Grace). The authors thank Béatrice Le Ray (INSERM U533) for expert technical assistance.

References

1. Lenègre J, Moreau PH. Le bloc auriculo-ventriculaire chronique: étude anatomique, clinique et histologique. *Arch Mal Cœur*. 1963;56:867-888.
2. Lev M. Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Med*. 1964;37:742-748.
3. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet*. 1999;23:20-21.
4. Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Miallet G, Demolombe S, Schott JJ, Baró I, Escande D, Le Marec H. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:643-652.
5. 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 U S A*. 2002;99:6210-6215.
6. Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman A, Charpentier F, Escande D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform, II: pharmacological profile. *Cardiovasc Res*. 2001;50:328-334.
7. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*. 1998;274:H747-H751.
8. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.
9. Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Cunff M, Escande D, Leger JJ. Distinct molecular portraits of human failing hearts identified by dedicated cDNA microarrays. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:157-165.
10. van Veen TA, van Rijen HV, Wiegnerink RF, Opthof T, Colbert MC, Clement S, de Bakker JM, Jongsma HJ. Remodeling of gap junctions in mouse hearts hypertrophied by forced retinoic acid signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1411-1423.
11. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol*. 1964;78:69-72.

12. Alcoléa S, Jarry-Guichard T, de Bakker J, Gonzalez D, Lamers W, Coppens S, Barrio L, Jongsma H, Gros D, van Rijen H. Replacement of connexin40 by connexin45 in the mouse: impact on cardiac electrical conduction. *Circ Res*. 2004;94:100–109.
13. Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res*. 2003;92:159–168.
14. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmbhatt B, Brown K, Bause B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001;10:189–194.
15. van Oosterhout MF, Prinzen FW, Arts T, Schreuder JJ, Vanagt WY, Cleutjens JP, Reneman RS. Asynchronous electrical activation induces asymmetrical hypertrophy of the left ventricular wall. *Circulation*. 1998;98:588–595.
16. Gros D, Dupays L, Alcoléa S, Meysen S, Miquerol L, Theveniau-Ruissy M. Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart: new models for cardiovascular research. *Cardiovasc Res*. 2004;62:299–308.
17. Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P, Jongsma H, Nargeot J, Gros D. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63:77–86.
18. Okamoto Y, Chaves A, Chen J, Kelley R, Jones K, Weed HG, Gardner KL, Gangi L, Yamaguchi M, Klomkleaw W, Nakayama T, Hamlin RL, Carnes C, Altschuld R, Bauer J, Hai T. Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction. *Am J Pathol*. 2001;159:639–650.
19. Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Altered molecular response to adrenoceptor-induced cardiac hypertrophy in Egr-1-deficient mice. *Am J Physiol*. 2000;278:H796–H805.
20. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998;392:293–296.
21. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992–2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1665–1671.
22. Tukkier R, Sogaard P, Vleugels J, de Groot IK, Wilde AA, Tan HL. Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome. *Circulation*. 2004;109:1272–1277.
23. Martini B. Further confirmation that a conduction disturbance underlies the electrocardiographic pattern of the so-called Brugada syndrome. *Circulation*. 2004;110:e53. Letter.
24. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081–3086.
25. van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O, Willecke K, Opthof T, Jongsma HJ, de Bakker JM. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation*. 2001;103:1591–1598.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelwahid E, Pelliniemi LJ, Szucsik JC, Lessard JL, Jokinen E. Cellular disorganization and extensive apoptosis in the developing heart of mice that lack cardiac muscle alpha-actin: apparent cause of perinatal death. *Pediatr Res*. 2004, 55, 197-204.

Abriel H, Kass RS. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 2005, 15, 35-40.

Anumonwo JM, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J. Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circ Res*. 2001, 89, 329-335.

Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA & Nademanee K. Brugada syndrome: 1992–2002. A historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003, 41, 1665–1671.

Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2002, 109, 357-362.

Arad M, Moskowitz IP, Patel VV, Ahmad F, Perez-Atayde AR, Sawyer DB, Walter M, Li GH, Burgon PG, Maguire CT, Stapleton D, Schmitt JP, Guo XX, Pizard A, Kupersmidt S, Roden DM, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy. *Circulation*. 2003, 107, 2850-2856.

Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacene E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Amthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet*. 2005, 14, 155-169.

Babij P, Askew GR, Nieuwenhuijsen B, Su CM, Bridal TR, Jow B, Argentieri TM, Kulik J, DeGennaro LJ, Spinelli W, Colatsky TJ. Inhibition of cardiac delayed rectifier K⁺ current by overexpression of the long-QT syndrome HERG G628S mutation in transgenic mice. *Circ Res*. 1998, 83, 668-678.

Balasubramaniam R, Grace AA, Saumarez RC, Vandenberg JI, Huang CL. Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1. *J Physiol*. 2003, 552, 535-546.

Baruscotti M, DiFrancesco D, Robinson R B. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1996, 492, 21–30.

Baskin EP, Lynch JJ Jr. Differential atrial versus ventricular activities of class III potassium channel blockers. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998, 285, 135-142.

Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*. 2003, 112, 1019-1028.

Benson DW. Genetics of atrioventricular conduction disease in humans. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004, 280, 934-939.

Bernink PJ, Prager G, Schelling A, Kobrin I. Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): a new generation of calcium antagonists? Mibefradil International Study Group. *Hypertension*. 1996, 27, 426-432.

Bertran GC, Biagetti MO, Valverde ER, Quinteiro RA. Effects of amiodarone and desethylamiodarone on the inward rectifying potassium current (IK1) in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998, 31, 914-920.

Berul CI, Aronovitz MJ, Wang PJ, Mendelsohn ME. In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation*. 1996, 94, 2641–2648.

Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest*. 1997, 99, 570-576.

Bettahi I, Marker CL, Roman MI, Wickman K. Contribution of the Kir3.1 subunit to the muscarinic-gated atrial potassium channel IKACH. *J Biol Chem*. 2002, 277, 48282-48288.

Bevilacqua LM, Simon AM, Maguire CT, Gehrmann J, Wakimoto H, Paul DL, Berul CI. A targeted disruption in connexin 40 leads to distinct atrioventricular conduction defects. *J Interv Card Electrophysiol*. 2000, 4, 459-467.

Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*. 1999, 85, 1206-1213.

Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res*. 2003, 92, 159-168.

Billette J. Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium. *Am J Physiol*. 1987, 252, H163-177.

Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I, Watkins H. Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 2001, 10, 1215-1220.

Boccanelli A, Battagliese A. Effects of aldosterone receptor blocker therapy on cardiac remodeling. *G Ital Nefrol*. 2006, 23, S57-63.

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*. 2000, 481, 73-76.

Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol*. 1996;118, 1051-1057.

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1999, 21, 285-288.

Bonnet D, Martin D, Pascale De Lonlay, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M, Saudubray

JM. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation*. 1999, 100, 2248-2253.

Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G; Ivabradine Investigators Group. Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation*. 2003;107, 817-823.

BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_h) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol*. 1993, 110, 343-349.

Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, Tseng CE, DiDonato F, Rashbaum W, Morris A, el-Sherif N, Buyon JP. Arrhythmogenicity of IgG and anti-52-kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circ Res*. 1997, 80, 354-362.

Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, Tseng CE, El-Sherif N, Buyon JP. Serum and immunoglobulin G from the mother of a child with congenital heart block induce conduction abnormalities and inhibit L-type calcium channels in a rat heart model. *Pediatr Res*. 1998; 44, 11-19.

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*. 1998, 275, H1158-1168.

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

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*. 2006, 42, 175-197.

Brady WJ Jr & Harrigan RA. Diagnosis and management of bradycardia and atrioventricular block associated with acute coronary ischemia. *Emerg. Med. Clin. North AM*. 2001, 19, 371-384.

Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol*. 2003, 546, 403-413.

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

Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*. 2001, 106, 709-721.

Brunet S, Aimond F, Guo W, Li H, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol*. 2004, 559, 103-120.

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

Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch*. 1987, 408, 18-26.

Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, Vary JC Jr, Greene AE, Franz MR, Grinberg A, Huang SP, Pfeifer K. Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98, 2526-2531.

Chauhan VS, Tuvia S, Buhusi M, Bennett V, Grant AO. Abnormal cardiac Na⁺ channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ Res*. 2000, 86, 441-447.

Chaves AA, Dech SJ, Nakayama T, Hamlin RL, Bauer JA, Carnes CA. Age and anesthetic effects on murine electrocardiography. *Life Sciences*. 2003, 72, 2401-2412.

Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science*. 2003, 302, 1416-1418.

Chen HH, Baty CJ, Maeda T, Brooks S, Baker LC, Ueyama T, Gursoy E, Saba S, Salama G, London B, Stewart AF. Transcription enhancer factor-1-related factor-transgenic mice

develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation. *Circulation*. 2004, 110, 2980-2987.

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

Choate JK, Danson EJF, Morris JF, Paterson DJ. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001, 281, H2310-2317.

Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 286, H1757-1766.

Clarkson CW, Follmer CH, Ten Eick RE, Hondeghem LM, Yeh JZ. Evidence for two components of sodium channel block by lidocaine in isolated cardiac myocytes. *Circ Res*. 1988, 63, 869-878.

Clarkson CW, Hondeghem LM. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology*. 1985, 62, 396-405.

Cohen RM, Foell JD, Balijepalli RC, Shah V, Hell JW, Kamp TJ. Unique modulation of L-type Ca²⁺ channels by short auxiliary beta1d subunit present in cardiac muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 288, H2363-2374.

Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res*. 1998, 82, 232-243.

Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de Groot JR, Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, de Bakker JM. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation*. 2005, 112, 2769-2777

Couette B, Marger L, Nargeot J, Mangoni ME. Physiological and pharmacological insights into the role of ionic channels in cardiac pacemaker activity. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*. 2006, 6, in press.

Curtis MJ, Walker MJA. The mechanism of action of calcium antagonists on arrhythmias in early myocardial ischaemia: studies with nifedipine and DHM 9. *Br J Pharmacol*. 1988, 94, 1275-1286.

Da Costa D, Brady WJ, Edhouse J. Bradycardias and atrioventricular conduction block. *BMJ*. 2002, 324, 535-538.

Davies MJ. Pathology of atrial arrhythmias. In: *MJ Davies, RH Anderson and AE Becker eds. The conduction system of the heart. London, Butterworths*. 1983, 203-215.

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

De Angelis K, Wich RB, Jesus WRA, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol*. 2004, 96, 2174-2178.

de Groot JR, Veenstra T, Verkerk AO, Wilders R, Smits JP, Wilms-Schopman FJ, Wiegerinck RF, Bourier J, Belterman CN, Coronel R, Verheijck EE. Conduction slowing by the gap junctional uncoupler carbenoxolone. *Cardiovasc Res*. 2003, 60, 288-297.

Demir SS, Clark JW, Murphey CR, Giles WR. A mathematical model of a rabbit sinoatrial node cell. *Am. J. Physiol*. 1994, 266, C832-852.

Demoulin GC & Kulbertus HE. Histopathological examination of concept of left hemiblock. *Br Heart J*. 1972, 34, 807-814.

DiFrancesco D, Noma A, Trautwein W. Kinetics and magnitude of the time-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node: effect of external potassium. *Pflugers. Arch.*, 1979, 381, 271-279.

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

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

DiFrancesco D. Cardiac pacemaker I(f) current and its inhibition by heart rate-reducing agents. *Curr Med Res Opin.* 2005, 21, 1115-1122.

DiFrancesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res.* 2006, 53, 399-406.

DiMarco JP, Sellers TD, Berne RM, West GA, Belardinelli L. Adenosine: electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation.* 1983, 68, 1254-1263.

Dobrzynski H, Nikolski VP, Sambelashvili AT, Greener ID, Yamamoto M, Boyett MR, Efimov IR. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res.* 2003, 93, 1102-1110.

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res.* 1998, 39, 34-49.

Dokos S, Celler BG, Lovell NH. Modification of DiFrancesco-Noble equations to simulate the effects of vagal stimulation on in vivo mammalian sinoatrial node electrical activity. *Ann. Biomed. Eng.* 1993, 21, 321-335.

Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, Fairchild-Huntress V, Xu J, Lorenz JN, Kadambi V, Berul CI, Breitbart RE. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol.* 2003, 35, 1043-1053.

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat. Cell. Biol.* 2000, 2, 173-177.

Echt DS, Black JN, Barbey JT, Cox DR, Cato E. Evaluation of antiarrhythmic drugs on defibrillation energy requirements in dogs. Sodium channel block and action potential prolongation. *Circulation.* 1989, 79, 1106-1117.

Efimov IR, Nikolski VP, Rothenberg F, Greener ID, Li J, Dobrzynski H, Boyett M. Structure-function relationship in the AV junction. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004, 280, 952-965.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95, 14863-14868.

Eloff BC, Gilat E, Wan X, Rosenbaum DS. Pharmacological modulation of cardiac gap junctions to enhance cardiac conduction: evidence supporting a novel target for antiarrhythmic therapy. *Circulation.* 2003, 108, 3157-3163.

Exil VJ, Gardner CD, Rottman JN, Sims H, Bartelds B, Khuchua Z, Sindhal R, Ni G, Strauss AW. Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 290, H1289-1297.

Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Nuyens D, Rossenbacker T, Ottenhof A, Haverkamp W, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P. Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKPQ SCN5A (long QT3) mice. *Cardiovasc Res.* 2003, 57, 1085-1093.

Fabritz L, Kirchhof P, Fortmuller L, Auchampach JA, Baba HA, Breithardt G, Neumann J, Boknik P, Schmitz W. Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block, and bradycardiomyopathy in mice overexpressing A(3) adenosine receptors. *Cardiovasc Res.* 2004, 62, 500-508.

Fareh S, Benardeau A, Thibault B, Nattel S. The T-type Ca(2+) channel blocker mibefradil prevents the development of a substrate for atrial fibrillation by tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Circulation.* 1999, 100, 2191-2197.

Fareh S, Benardeau A, Nattel S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Cardiovasc Res.* 2001, 49, 762-770.

Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ Jr,

Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 1999, 341, 1715-1724.

Freedman MD, Somberg JC. Pharmacology and pharmacokinetics of amiodarone. *J Clin Pharmacol*. 1991, 31, 1061-1069.

Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, Russo MA. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation*. 2005, 112, 3680-3687.

Gard JJ, Yamada K, Green KG, Eloff BC, Rosenbaum DS, Wang X, Robbins J, Schuessler RB, Yamada KA, Saffitz JE. Remodeling of gap junctions and slow conduction in a mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2005, 67, 539-547.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1995, 115, 579-586.

Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin. *Circ Res*. 2006, 99, 407-414.

Gehrmann J, Meister M, Maguire CT, Martins DC, Hammer PE, Neer EJ, Berul CI, Mende U. Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein betagamma-subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002, 282, H445-456.

Gloss B, Trost S, Bluhm W, Swanson E, Clark R, Winkfein R, Janzen K, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann W. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology*. 2001, 142, 544-550.

Gollob MH, Seger JJ, Gollob TN, Tapscott T, Gonzales O, Bachinski L, Roberts R. Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2001, 104, 3030-3033.

Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest.* 2002, 110, 1201-1209.

Greenspahn BR, Denes P, Daniel W, Rosen KM. Chronic bifascicular block: evaluation of familial factors. *Ann Intern Med.* 1976, 84, 521-525.

Gregoratos G. Sick sinus syndrome *Circulation.* 2003, 108, e143-e144.

Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res.* 2003, 92, 14-22.

Gros D, Abran P, Alcoléa S, Dupays L, Mialhe A, Hervé JC, Miquerol L, Théveniau-Ruissy M. Connexines et canaux jonctionnels. Leur rôle dans la propagation de l'influx dans le cœur. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux : Chapitre 4*, Flammarion 2002.

Gros D, Dupays L, Alcolea S, Meysen S, Miquerol L, Theveniau-Ruissy M. Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc Res.* 2004, 62, 299-308.

Guerra JM, Everett TH 4th, Lee KW, Wilson E, Olgin JE. Effects of the gap junction modifier rotigaptide (ZP123) on atrial conduction and vulnerability to atrial fibrillation. *Circulation.* 2006, 114, 110-118.

Guo J, Mitsuiye T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. *Pflugers Arch.* 1997, 433, 390-396.

Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ. Res.* 2002, 90, 586-593.

Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation.* 1999, 99, 1508-1515.

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

Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K⁺ current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. *J. Physiol.* 1996, 490, 337-350.

Han X, Kubota I, Feron O, Opel DJ, Arstall MA, Zhao Y-Y, Huang P, Fishman MC, Michel T, Kelly RA. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I_{Ca-L} is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 6510-6515.

Han W, Wang Z, Nattel S. A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000, 279, H466-474.

Han W, Wang Z, Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001, 280, H1075-1080.

Han W, Bao W, Wang Z, Nattel S. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res.* 2002, 91, 790-797.

Hancox JC, Mitcheson JS. Ion channel and exchange currents in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Can J Cardiol.* 1997, 13, 1175-1182.

Hancox JC, Patel KC, Jones JV. Antiarrhythmics--from cell to clinic: past, present, and future. *Heart.* 2000, 84, 14-24.

Haworth RA, Goknur AB, Berkoff HA. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels of adult rat heart cells by antiarrhythmic drugs. *Circ Res.* 1989, 65, 1157-1160.

Heath BM, Terrar DA. Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I_{Kr}, through a reduction in C-type inactivation in guineapig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 2000, 522, 391-402.

Hecht HH, Kossmann CE, Childers RW, Langendorf R, Lev M, Rosen KM, Pruitt RD, Truex RC, Uhley HN, Watt TB Jr. Atrioventricular and intraventricular conduction. Revised nomenclature and concepts. *Am J Cardiol.* 1973, 31, 232-244.

Heinritz W, Shou L, Moschik A, Froster UG. The human TBX5 gene mutation database. *Hum Mutat.* 2005, 26, 397.

Hejtmancik MR, Herrmann GR, Shields AH, Wright JC. A clinical study of complete heart block. *Am Heart J.* 1956, 52, 369-378.

Herfst LJ, Potet F, Bezzina CR, Groenewegen WA, Le Marec H, Hoorntje TM, Demolombe S, Baro I, Escande D, Jongsma HJ, Wilde AA, Rook MB. Na⁺ channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects. *J Mol Cell Cardiol.* 2003, 35, 549-557.

Hershberger RE, Hanson EL, Jakobs PM, Keegan H, Coates K, Bousman S, Litt M. A novel lamin A/C mutation in a family with dilated cardiomyopathy, prominent conduction system disease, and need for permanent pacemaker implantation. *Am Heart J.* 2002, 144, 938-940.

Hirano Y, Fozzard HA, January CT. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol.* 1989, 256, H1478-1492.

Hoffman BF, De Carvalho AP, Mello WC, Cranefield PF. Electrical activity of single fibers of the atrioventricular node. *Circ Res.* 1959, 7, 11-18.

Hondeghem LM, Katzung BG. Time and voltage dependent interaction of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta.* 1977, 472, 373-398.

Hondeghem LM, Katzung BG. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1984, 24, 387-423.

Honjo H, Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Block of cardiac sodium channels by amiodarone studied by using V_{max} of action potential in single ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 1991, 102, 651-656.

Honjo H, Lei M, Boyett MR, Kodama I. Heterogeneity of 4-aminopyridinesensitive current in rabbit sinoatrial node cells. *Am. J. Physiol.* 1999, 276, H1295-1304.

Howarth FC, Levi AJ, Hancox JC. Characteristics of the delayed rectifier K current compared in myocytes isolated from the atrioventricular node and ventricle of the rabbit heart. *Pflugers Arch.* 1996, 431, 713-722.

Hu K, Qu Y, Yue Y, Boutjdir M. Functional basis of sinus bradycardia in congenital heart block. *Circ Res.* 2004, 94, 32-38.

Huycke EC, Sung RJ, Dias VC, Milstein S, Hariman RJ, Platia EV. Intravenous diltiazem for termination of reentrant supraventricular tachycardia: A placebo-controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *J Am Coll Cardiol.* 1989, 13, 538-544.

Imaizumi S, Mazgalev T, Dreifus LS, Michelson EL, Miyagawa A, Bharati S, Lev M. Morphological and electrophysiological correlates of atrioventricular nodal response to increased vagal activity. *Circulation.* 1990, 82, 951-964.

Ino M, Yoshinaga T, Wakamori M, Miyamoto N, Takahashi E, Sonoda J, Kagaya T, Oki T, Nagasu T, Nishizawa Y, Tanaka I, Imoto K, Aizawa S, Koch S, Schwartz A, Niidome T, Sawada K, Mori Y. Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98, 5323-5328.

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

Ivanov SV, Ward JM, Tessarollo L, McAreavey D, Sachdev V, Fananapazir L, Banks MK, Morris N, Djurickovic D, Devor-Henneman DE, Wei MH, Alvord GW, Gao B, Richardson JA, Minna JD, Rogawski MA, Lerman MI. Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am J Pathol.* 2004, 165, 1007-1018.

James TN. Cardiac innervation: anatomic and pharmacologic relations. *Bull N Y Acad Med.* 1967, 43, 1041-1086.

Janse MJ, Van Capelle FJL, Anderson RH, Touboul P, Billette J. Electrophysiology and structure of the atrioventricular node of the rabbit heart. In: *The conduction system of the heart, edited by HJJ Wellens, KJ Lie and MJ Janse. Leiden: Stenfert Kroese.* 1976, 296-315.

Jay PY, Harris BS, Maguire CT, Buerger A, Wakimoto H, Tanaka M, Kupersmidt S, Roden DM, Schultheiss TM, O'Brien TX, Gourdie RG, Berul CI, Izumo S. Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest.* 2004, 113, 1130-1137.

Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res.* 1993, 72, 75-83.

Jost N, Virag L, Hala O, Varro A, Thormahlen D, Papp JG. Effect of the antifibrillatory compound tedisamil (KC-8857) on transmembrane currents in mammalian ventricular myocytes. *Curr Med Chem.* 2004, 11, 3219-3228.

Kaab S, Schulze-Bahr E. Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2005, 67, 397-413.

Karraya S, Arlock P, Katzung BG, Hondeghem LM. Diltiazem and verapamil preferentially block inactivated calcium channels. *J Mol Cell Cardiol.* 1983, 15, 145-148.

Kasahara H, Lee B, Schott JJ, Benson DW, Seidman JG, Seidman CE, Izumo S. Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2.5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *J Clin Invest.* 2000, 106, 299-308.

Kasahara H, Wakimoto H, Liu M, Maguire CT, Converso KL, Shioi T, Huang WY, Manning WJ, Paul D, Lawitts J, Berul CI, Izumo S. Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Clin Invest.* 2001, 108, 189-201.

Kehl HG, Haverkamp W, Rellensmann G, Yelbuz TM, Krasemann T, Vogt J, Schulze-Bahr E. Images in cardiovascular medicine. Life-threatening neonatal arrhythmia: successful treatment and confirmation of clinically suspected extreme long QT-syndrome-3. *Circulation.* 2004, 109, e205-206.

Ketch T, Biaggioni I, Robertson R, Robertson D. Four faces of baroreflex failure: hypertensive crisis, volatile hypertension, orthostatic tachycardia, and malignant vagotonia. *Circulation.* 2002, 105, 2518-2523.

Khoo MS, Kannankeril PJ, Li J, Zhang R, Kupersmidt S, Zhang W, Atkinson JB, Colbran RJ, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase II activity is required for normal atrioventricular nodal conduction. *Heart Rhythm*. 2005, 2, 634-640.

Kirchhof P, Fabritz L, Fortmuller L, Matherne GP, Lankford A, Baba HA, Schmitz W, Breithardt G, Neumann J, Boknik P. Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A1 adenosine receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003, 285, H145-153.

Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, Thonnissen E, Kruger O, Lamers WH, Willecke K. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ Res*. 2000, 87, 399-405.

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

Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM. Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am. J. Physiol*. 1997, 272, H2793-2806.

Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res*. 1997, 35, 13-29.

Kohlhardt M, Fichtner H, Froebe U, Herzig JW. On the mechanism of drug-induced blockade of Na⁺ currents: interaction of antiarrhythmic compounds with DPI-modified single cardiac Na⁺ channels. *Circ Res*. 1989, 64, 867-881.

Komeichi K, Tohse N, Nakaya H, Shimizu M, Zhu MY, Kanno M. Effects of N-acetylprocainamide and sotalol on ion currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 1990, 187, 313-322.

Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J. α 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem*. 2001, 276, 22100-22106.

Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., Clapham, D.E., G beta gamma binds directly to the G protein-gated K⁺ channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 29059-29062.

Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res.* 2005, 96, 1169-1177.

Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K. Connexin 30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103, 5959-5964.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin 45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 2000, 127, 3501-3512.

Kuro-O M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997, 390, 45-51.

Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res.* 1999, 84, 146-152.

Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation.* 2001, 10, 3081-3086.

Labrid C, Grosset A, Dureng G, Mironneau J, Duchene-Marullaz P. Some membrane interactions with bepridil, a new antianginal agent. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979, 211, 546-554.

Lahera V, Cachofeiro V, Balfagon G, Rodicio JL. Aldosterone and its blockade: a cardiovascular and renal perspective. *ScientificWorldJournal.* 2006, 6, 413-424.

Lakatta EG and Sollott SJ. Perspectives on mammalian cardiovascular aging humans to molecules. *Comp Biochem Physiol.* 2002, 132, 699-721.

Lakatta EG. Beyond bowditch: the convergence of cardiac chronotropy and inotropy. *Cell Calcium.* 2004, 35, 629-642.

Laitinen-Forsblom PJ, Makynen P, Makynen H, Yli-Mayry S, Virtanen V, Kontula K, Aalto-Setälä K. SCN5A mutation associated with cardiac conduction defect and atrial arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006, 17, 480-485.

Lammerding J, Hsiao J, Schulze PC, Kozlov S, Stewart CL, Lee RT. Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol.* 2005, 170, 781-791.

Lancaster MK, Jones SA, Harrison SM, Boyett MR. Intracellular Ca²⁺ and pacemaking within the rabbit sinoatrial node: heterogeneity of role and control. *J. Physiol.* 2004, 556, 481-494.

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

Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, Lande G, Siavoshian S, Baro I, Pond AL, Nerbonne JM, Leger JJ, Escande D, Charpentier F. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res.* 2003, 92, 234-242.

Le Bouter S, El Harchi A, Marionneau C, Bellocq C, Chambellan A, van Veen T, Boixel C, Gavillet B, Abriel H, Le Quang K, Chevalier JC, Lande G, Léger JJ, Charpentier F, Escande D, Demolombe S. Long-term amiodarone administration remodels expression of ion channel transcripts in the mouse heart. *Circulation.* 2004, 110, 3028-3035.

Lee KS, Lee EW. Ionic mechanism of ibutilide in human atrium: evidence for a drug-induced Na⁺ current through a nifedipine inhibited inward channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 286, 9-22.

- Lees-Miller JP, Guo J, Somers JR, Roach DE, Sheldon RS, Rancourt DE, Duff HJ. Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates I(Kr) in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. *Mol Cell Biol*. 2003, 23, 1856-1862.
- Lei M, Honjo H, Kodama I, Boyett MR. Heterogeneous expression of the delayed-rectifier K currents iK,r and iK,s in rabbit sinoatrial node cells. *J. Physiol*. 2001, 535, 703-714.
- 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*. 2004, 559, 835- 848.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, and Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem*. 2004, 279, 19051–19063.
- Levy, M.N., Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ. Res*. 1971, 29, 437-445.
- Lenègre J, Moreau PH. Le bloc auriculo-ventriculaire chronique. Etude anatomique, clinique et histologique. *Arch. Mal. Cœur*. 1963, 56, 867-888.
- Lev M. Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Med*. 1964, 37, 742-748.
- Lev M, Kinare SG, Pick A. The pathogenesis of atrioventricular block in coronary disease. *Circulation*. 1970, 42, 409-425.
- Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science*. 1993, 261, 1439-1442.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res*. 1996, 78, 903-915.
- Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 287, H2790-2802.

Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkentin JD, Radice GL. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res*. 2005, 97, 474-481.

Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Asanuma H, Minamino T, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Benidipine, a long-acting calcium channel blocker, inhibits cardiac remodeling in pressure-overloaded mice. *Cardiovasc Res*. 2005, 65, 879-888.

Light PE, Wallace CH, Dyck JR. Constitutively active adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Circulation*. 2003, 107, 1962-1965.

Liu Y, Zeng W, Delmar M, Jalife J. Ionic mechanisms of electronic inhibition and concealed conduction in rabbit atrioventricular nodal myocytes. *Circulation*. 1993, 88, 1634-1646.

Liu G, Iden JB, Kovithavongs K, Gulamhusein R, Duff HJ, Kavanagh KM. In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave. *J Physiol*. 2004, 555, 267-279.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001, 25, 402-408.

Lombardi R, Betocchi S. Aetiology and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy. *Acta Paediatr Suppl*. 2002, 91, 10-14.

London B, Wang DW, Hill JA, Bennett PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J. Physiol*. 1998, 509, 171-182.

London B, Pan XH, Lewarchik CM, Lee CS. Qt interval prolongation and arrhythmias in heterozygous Merg1-targeted mice. *Circulation*. 1998, 98, I-56. Abstract

Lu S & Hoey A. Changes in function of cardiac receptors mediating the effects of the autonomic nervous system in the muscular dystrophy (MDX) mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2000, 32, 143-152.

Lu ZJ, Pereverzev A, Liu HL, Weiergraber M, Henry M, Krieger A, Smyth N, Hescheler J, Schneider T. Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Cell Physiol Biochem*. 2004, 14, 11-22.

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*. 1999,18, 2323-2329.

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

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 U S A*. 2003, 100, 3507-3512.

Maisch B & Ristic AD. Immunological basis of the cardiac conduction and rhythm disorders. *EurHeart J*. 2001, 22, 813-824.

Makita N, Sasaki K, Groenewegen WA, Yokota T, Yokoshiki H, Murakami T, Tsutsui H. Congenital atrial standstill associated with coinheritance of a novel SCN5A mutation and connexin 40 polymorphisms. *Heart Rhythm*. 2005, 2, 1128-1134.

Makiyama T, Akao M, Tsuji K, Doi T, Ohno S, Takenaka K, Kobori A, Ninomiya T, Yoshida H, Takano M, Makita N, Yanagisawa F, Higashi Y, Takeyama Y, Kita T, Horie M. High risk for bradyarrhythmic complications in patients with Brugada syndrome caused by SCN5A gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2005, 46, 2100-2106.

Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem*. 2000 14, 275, 11383-11388.

Maltsev VA, Undrovinas AI. Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am J Physiol*. 1997, 273, H1832-1840.

Maltsev VA, Vinogradova TM, Lakatta EG. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci*. 2006, 100, 338-369.

Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res.* 2001, 52, 51-64.

Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003, 100, 5543-5548.

Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2006, 90, 38-63.

Manning AS, Bruyninckx C, Ramboux J, Chatelain P. SR 33589, a new amiodarone-like agent: effect on ischemia-and reperfusion-induced arrhythmias in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995, 26, 453-461.

Marger L, Mangoni ME, Nargeot J. Analysis of pacemaker activity and ionic channels in mouse atrioventricular cells. *Arch Mal Cœur.* 2006, 99, 369. Abstract.

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.* 2005, 562, 223-234.

Massing GK, James TN. Anatomical configuration of the His bundle and bundle branches in the human heart. *Circulation.* 1976, 53, 609-621.

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

Mazel JA, El-Sherif N, Buyon J, Boutjdir M. Electrocardiographic abnormalities in a murine model injected with IgG from mothers of children with congenital heart block. *Circulation.* 1999, 99, 1914-1918.

Mazgalev TN, Ho SY, Anderson RH. Anatomic-electrophysiological correlations concerning the pathways for atrioventricular conduction. *Circulation.* 2001, 103, 2660-2667.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994, 74, 365-507.

McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003, 42, 1650-1655.

Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res.* 2005, 67, 448-458.

Medkour D, Becker AE, Khalife K, Billette J. Anatomic and functional characteristics of a slow posterior AV nodal pathway: role in dual-pathway physiology and reentry. *Circulation.* 1998, 98, 164-174.

Meijler FL & Janse MJ. Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node. *Physiol Rev.* 1988, 68, 608-647.

Milanesi R, Baruscotti M, Gnecci-Ruscone T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med.* 2006, 354, 151-157.

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

Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol.* 1998, 274, 747-751.

Mitchell JW, Larsen JK, Best PM. Identification of the calcium channel alpha 1E (Ca(v)2.3) isoform expressed in atrial myocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1577, 17-26.

Mitcheson JS, Hancox JC. Characteristics of a transient outward current (sensitive to 4-aminopyridine) in Ca²⁺-tolerant myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Pflugers Arch.* 1999, 438, 68-78.

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

Mizuta E, Miake J, Yano S, Furuichi H, Manabe K, Sasaki N, Igawa O, Hoshikawa Y, Shigemasa C, Nanba E, Ninomiya H, Hidaka K, Morisaki T, Tajima F, Hisatome I. Subtype switching of T-type Ca²⁺ channels from Cav3.2 to Cav3.1 during differentiation of embryonic stem cells to cardiac cell lineage. *Circ J*. 2005, 69, 1284-1289.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003; 421, 634-639.

Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, Bennett V. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101, 9137-9142.

Monnet X, Ghaleh B, Colin P, de Curzon OP, Giudicelli JF, Berdeaux A. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 299, 1133-1139.

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*. 2001, 268, 1646-1652.

Morgans CM, Gray KE, Robb GH. A survey of familial heart block. *Br Heart J*. 1974, 36, 693-696.

Mori K, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Effects of class III antiarrhythmic drugs on the Na(+)-activated K⁺ channels in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol*. 1996, 119, 133-141.

Mori AD, Bruneau BG. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr Opin Cardiol*. 2004, 19, 211-215.

Mouse Phenome Database : <http://www.jax.org/phenome>

Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective If current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*. 2004, 109, 1674-1679.

Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol*. 1996, 493, 801-818.

Musa H, Lei M, Honjo H, Jones SA, Dobrzynski H, Lancaster MK, Takagishi Y, Henderson Z, Kodama I, Boyett MR. Heterogeneous expression of 50 Ca²⁺ handling proteins in rabbit sinoatrial node. *J. Histochem. Cytochem*. 2002, 50, 311-324.

Nagatsu M, Spinale FG, Koide M, Tagawa H, DeFreitas G, Cooper G 4th, Carabello BA. Bradycardia and the role of beta-blockade in the amelioration of left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2000, 101, 653-659.

Nakamura K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ, Duff HJ, Opas M, Kavanagh K, Michalak M. Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest*. 2001, 107, 1245-1253.

Napolitano C, Rivolta I, Priori SG. Cardiac sodium channel diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2003, 41, 439-444.

Nattel S, Talajic M, Quantz M, De Roode M. Frequency-dependent effects of amiodarone on atrio-ventricular nodal function and slow-channel action potentials: evidence for calcium channel-blocking activity. *Circulation*. 1987, 76, 442-449.

Nattel S, Liu L, St-Georges D. Effects of the novel antiarrhythmic agent azimilide on experimental atrial fibrillation and atrial electrophysiologic properties. *Cardiovasc Res*. 1998, 37, 627-635.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res*. 2001, 89, 944-956.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005, 85, 1205-1253.

Nguyen-Tran VT, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB, Ruiz-Lozano P, Barrere-Lemaire S, Kondo R, Norman LW, Gourdie RG, Rahme MM, Feld GK, Clark RB,

Giles WR, Chien KR. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell*. 2000, 102, 671-682.

Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalicek J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004, 113, 357-369.

Nishii K, Kumai M, Egashira K, Miwa T, Hashizume K, Miyano Y, Shibata Y. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun Adhes*. 2003, 10, 365-369.

Nitta JI, Sunami A, Marumo F, Hiraoka M. States and sites of actions of flecainide on guinea-pig cardiac sodium channels. *Eur J Pharmacol*. 1992, 214, 191-197.

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

Noble D. A modification of the Hodgkin--Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. *J Physiol*. 1962, 160, 317-352.

Noble D. Will genomics revolutionise pharmaceutical R&D? *Trends Biotechnol*. 2003, 21, 333-337.

Noma A, Irisawa H, Kolobun S, Kotake H, Nishimura A, Watanabe Y. Slow current systems in the AV node of the rabbit heart. *Nature*. 1980, 285, 228-229.

Norris RM, Barnaby PF, Brown MA, Geary GG, Clarke ED, Logan RL, Sharpe DN. Prevention of ventricular fibrillation during acute myocardial infarction by intravenous propranolol. *Lancet*. 1984, 2, 883-886.

Okamoto Y, Chaves A, Chen J, Kelley R, Jones K, Weed HG, Gardner KL, Gangi L, Yamaguchi M, Klomkleaw W, Nakayama T, Hamlin RL, Carnes C, Altschuld R, Bauer J, Hai T. Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a

stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction. *Am J Pathol.* 2001, 159, 639-650.

Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, Horton SC, Rodeheffer RJ, Anderson JL. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA.* 2005, 293, 491-493.

Ono K, Iijima T. Pathophysiological significance of T-type Ca^{2+} channels: properties and functional roles of T-type Ca^{2+} channels in cardiac pacemaking. *J Pharmacol Sci.* 2005, 99, 197-204.

Ou Y, Strege P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, Farrugia G. Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem.* 2003, 278, 1915-1923.

Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Liu PP, Backx PH. Role of L-type Ca^{2+} channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J Mol Med.* 2006, 84, 349-364.

Ozawa R, Hayashi YK, Ogawa M, Kurokawa R, Matsumoto H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol.* 2006, 168, 907-917.

Paes de Carvalho A & De Almeida DF. Spread of activity through the atrioventricular node. *Circ Res.* 1960, 8, 801-809.

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 U S A.* 2002, 99, 6210-6215.

Patel VV, Arad M, Moskowitz IP, Maguire CT, Branco D, Seidman JG, Seidman CE, Berul CI. Electrophysiologic characterization and postnatal development of ventricular pre-excitation in a mouse model of cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2003, 42, 942-951.

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

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. Archiv.* 1993, 423, 21-27.

Petrecca K, Amellal F, Laird DW, Cohen SA, Shrier A. Sodium channel distribution within the rabbit atrioventricular node as analysed by confocal microscopy. *J Physiol.* 1997, 501, 263-274.

Pinto JM, Sosunov EA, Gainullin RZ, Rosen MR, Boyden PA. Effects of mibefradil, a T-type calcium current antagonist, on electrophysiology of Purkinje fibers that survived in the infarcted canine heart. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999, 10, 1224-1235.

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

Pourrier M, Zicha S, Ehrlich J, Han W, Nattel S. Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers. *Circ Res.* 2003, 93, 189-191.

Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Mialet G, Demolombe S, Schott JJ, Baro I, Escande D, Le Marec H. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003, 41, 643-652.

Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006, 17, 270-275.

Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, Cohen IS, Robinson RB. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2004, 279, 43497-43502.

Qu Y, Baroudi G, Yue Y, Boutjdir M. Novel molecular mechanism involving α_{1D} (Ca_v1.3) L-Type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia. *Circulation.* 2005, 111, 3034-3041.

Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord.* 2004, 14, 491-496.

Ragueneau I, Laveille C, Jochemsen R, Resplandy G, Funck-Brentano C, Jaillon P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1998, 64, 192-203.

Remme WJ. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003, 17, 349-360.

Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J, Fishman GI. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development.* 2001, 128, 1785-1792.

Rigg L, Heath BM, Cui Y, Terrar DA. Localisation and functional significance of ryanodine receptors during beta-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sinoatrial node. *Cardiovasc. Res.* 2000, 48, 254-264.

Robinson RB, Brink PR, Cohen IS, Rosen MR. I(f) and the biological pacemaker. *Pharmacol Res.* 2006, 53, 407-415.

Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR, Hondeghem LM. Quinidine delays I_K activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 1988, 62, 1055-1058.

Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res.* 2004, 94, 874-883.

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

Royer A, Demolombe S, El Harchi A, Le Quang K, Piron J, Toumaniantz G, Mazurais D, Bellocq C, Lande G, Terrenoire C, Motoike HK, Chevallier JC, Loussouarn G, Clancy CE, Escande D, Charpentier F. Expression of human ERG K⁺ channels in the mouse heart exerts anti-arrhythmic activity. *Cardiovasc Res.* 2005, 65, 128-137.

Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005, 111, 1738-1746.

Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Altered molecular response to adrenoceptor-induced cardiac hypertrophy in Egr-1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000, 278, H796-805.

Saba S, Shusterman V, Usiene I, London B. Cardiac autonomic modulation by estrogen in female mice undergoing ambulatory monitoring and in vivo electrophysiologic testing. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2004, 9, 142-148.

Saba S, Janczewski AM, Baker LC, Shusterman V, Gursoy EC, Feldman AM, Salama G, McTiernan CF, London B. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 289, H1456-1467.

Sakai R, Hagiwara N, Matsuda N, Kassanuki H, Hosoda S. Sodium--potassium pump current in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1996, 490, 51-62.

Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature*. 1983, 303, 250-253.

Salameh A & Dhein S. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1719, 36-58.

Salerno DM, Dias VC, Kleiger RE, Tschida VH, Sung RJ, Sami M, Giorgi LV. Efficacy and safety of intravenous diltiazem for treatment of atrial fibrillation and atrial flutter. *Am J Cardiol*. 1989, 63, 1046-1061.

Sanna T, Dello Russo A, Toniolo D, Vytopil M, Pelargonio G, De Martino G, Ricci E, Silvestri G, Giglio V, Messano L, Zachara E, Bellocchi F. Cardiac features of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutations. *Eur Heart J*. 2003, 24, 2227-2236.

Sasaki S, Daitoku K, Iwasa A, Motomura S. NO is involved in MCh-induced accentuated antagonism via type II PDE in the canine blood-perfused SA node. *Am. J. Physiol.* 2000, 279, H2509-2518.

Sassine A, Massé C, Fajuri A, Hirsch JL, Labrid C, Puech P. Electrophysiologic effects of bepridil in the anesthetized dog studied by endocardiac electrodes. *Am J Cardiol.* 1984, 53, 1707-1711.

Sato N, Tanaka H, Habuchi Y, Giles WR. Electrophysiological effects of ibutilide on the delayed rectifier K(+) current in rabbit sinoatrial and atrioventricular node cells. *Eur J Pharmacol.* 2000, 404, 281-288.

Sato H. Class III antiarrhythmic drugs (amiodarone, bretylium and sotalol) on action potentials and membrane currents in rabbit sino-atrial node preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1991, 344, 674-681.

Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Juvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P, Brivet M. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis.* 1999, 22, 488-502.

Schoenmakers M, Ramakers C, van Opstal JM, Leunissen JD, Londono C, Vos MA. Asynchronous development of electrical remodeling and cardiac hypertrophy in the complete AV block dog. *Cardiovasc Res.* 2003, 59, 351-359.

Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vernaud G, Bachner L, Moisan JP, et al. Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet.* 1995, 57, 1114-1122.

Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science.* 1998, 281, 108-111.

Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 1999, 23, 20-21.

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 2002, 90, 939-950.

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

Scott JS, Maddison PJ, Taylor PV, Esscher E, Scott O., Skinner RP. Connective-tissue disease, antibodies to ribonucleoprotein, and congenital heart block. *N Engl J Med.* 1983, 309, 209-212.

Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F. Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type $\alpha 1C$ (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 39193-39199.

Seul KH, Tadros PN, Beyer EC. Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis. *Genomics.* 1997, 46, 120-126.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res.* 1999, 85, e1-6.

Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K^+ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J. Physiol.* 2000, 523, 593-605.

Shinagawa K, Derakhchan K, and Nattel S. Pharmacological prevention of atrial tachycardia induced atrial remodeling as a potential therapeutic strategy. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2003, 26, 752-764.

Shinohara T, Tomizuka K, Miyabara S, Takehara S, Kazuki Y, Inoue J, Katoh M, Nakane H, Iino A, Ohguma A, Ikegami S, Inokuchi K, Ishida I, Reeves RH, Oshimura M. Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down's syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001, 10, 1163-1175.

Shusterman V, Usiene I, Harrigal C, Lee JS, Kubota T, Feldman AM, London B. Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002, 282, H2076-H2083.

Silverman ME, Grove D, Upshaw CB Jr. Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation*. 2006, 113, 2775-2781.

Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995, 275, 659-666.

Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol*. 1998, 8, 295-298.

Singh BN, Nademanee K. Use of calcium antagonists for cardiac arrhythmias. *Am J Cardiol*. 1987, 59, 153B-162B.

Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, Renstrom E, Wietzorrek G, Berjukov S, Cavalli M, Walter D, Koschak A, Waldschutz R, Hering S, Bova S, Rorsman P, Pongs O, Singewald N, Striessnig JJ. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J. Clin. Invest*. 2004, 113, 1430-1439.

Smits JP, Veldkamp MW, Wilde AA. Mechanisms of inherited cardiac conduction disease. *Europace*. 2005, 7, 122-137.

Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balser JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol*. 2005, 38, 969-981.

Spinelli W, Hoffman BF. Mechanisms of termination of reentrant atrial arrhythmias by class I and class III antiarrhythmic agents. *Circ Res*. 1989, 65, 1565-1579.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 2000, 102, 1178-1185.

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*. 2004, 119, 19-31.

Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC, Keating MT. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, 102, 8089-8096.

Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95, 15753-15757.

St Amand TR, Lu JT, Chien KR. Defects in cardiac conduction system lineages and malignant arrhythmias: developmental pathways and disease. *Novartis Found Symp*. 2003, 250, 260-270.

Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 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*. 2003, 100, 15235-15240.

Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med*. 2004, 14, 23-28.

Swynghedauw B. Myocardial remodelling: pharmacological targets. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002, 11, 661-674.

Takehara N, Makita N, Kawabe J, Sato N, Kawamura Y, Kitabatake A, Kikuchi K. A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill. *J Intern Med*. 2004, 255, 137-142.

Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JK, Kamiya K, Kitaichi K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Iino S, Inden Y, Hirai M, Murohara T, Kodama I,

Nabeshima Y. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation*. 2004, 109, 1776-1782.

Talajic M, Nayebpour M, Jing W, Nattel S. Frequency-dependent effects of diltiazem on the atrioventricular node during experimental atrial fibrillation. *Circulation*. 1989, 80, 380-389.

Talajic M, Papadatos D, Villemaire C, Nayebpour M, Nattel S. Antiarrhythmic actions of diltiazem during experimental atrioventricular reentrant tachycardias. Importance of use-dependent calcium channel-blocking properties. *Circulation*. 1990, 81, 334-342.

Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, Morley GE. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res*. 2000, 87, 929-936.

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 2004, 62, 9-33.

Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*. 2001, 409, 1043-1047.

Temple J, Frias P, Rottman J, Yang T, Wu Y, Verheijck EE, Zhang W, Siprachanh C, Kanki H, Atkinson JB, King P, Anderson ME, Kupersmidt S, Roden DM. Atrial fibrillation in KCNE1-null mice. *Circ Res*. 2005, 97, 62-69.

Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol*. 1994, 112, 37-42.

Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation*. 1998, 97, 686-691.

Toft AD, Boon NA. Thyroid disease and the heart. *Heart*. 2000, 84, 455-460.

Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res*. 2001, 89, 437-444.

Tsuchiya Y, Arahata K. Emery-Dreifuss syndrome. *Curr Opin Neurol*. 1997, 10, 421-425.

Tseng GN, Boyden PA. Multiple types of Ca^{2+} currents in single canine Purkinje cells. *Circ Res*. 1989, 65, 1735-1750.

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*. 2004, 279, 27194-27198.

Undrovinas AI, Shander GS, Makielski JC. Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol*. 1995, 269, H203-214.

Undrovinas AI, Maltsev VA. Cytochalasin D alters kinetics of Ca^{2+} transient in rat ventricular cardiomyocytes: an effect of altered actin cytoskeleton? *J Mol Cell Cardiol*. 1998, 30, 1665-1670.

Vaidya D, Morley GE, Samie FH, Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart. A challenge to the critical mass hypothesis. *Circ Res*. 1999, 85, 174-181.

Valenzuela C, Bennett PB. Voltage- and use-dependent modulation of calcium channel current in guinea pig ventricular cells by amiodarone and des-oxo-amiodarone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991, 17, 894-902.

Valenzuela D, Han X, Mende U, Fankhauser C, Mashimo H, Huang P, Pfeffer J, Neer EJ, Fishman MC. $G_{\alpha(o)}$ is necessary for muscarinic regulation of Ca^{2+} channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94, 1727-1732.

VanderBrink BA, Sellitto C, Saba S, Link MS, Zhu W, Homoud MK, Estes NA 3rd, Paul DL, Wang PJ. Connexin40-deficient mice exhibit atrioventricular nodal and infra-Hisian conduction abnormalities. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000, 11, 1270-1276.

van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O, Willecke K, Opthof T, Jongsma HJ, de Bakker JM. Impaired conduction in the bundle

branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation*. 2001, 103, 1591-1598.

van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation*. 2004, 109, 1048-1055.

van Rijen HV, de Bakker JM, van Veen TA. Hypoxia, electrical uncoupling, and conduction slowing: Role of conduction reserve. *Cardiovasc Res*. 2005, 66, 9-11.

van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res*. 2001, 51, 217-229.

van Veen TA, van Rijen HV, van Kempen MJ, Miquerol L, Opthof T, Gros D, Vos MA, Jongsma HJ, de Bakker JM. Discontinuous conduction in mouse bundle branches is caused by bundle-branch architecture. *Circulation*. 2005, 112, 2235-2244.

van Veen TA, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CL, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JM, van Rijen HV. Impaired impulse propagation in *Scn5a*-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation*. 2005, 112, 1927-1935.

Vaughan Williams EM. The experimental basis for the choice of an anti-arrhythmic drug. *Adv Cardiol*. 1970, 4, 275-289.

Veldkamp MW, Wilders R, Baartscheer A, Zegers JG, Bezzina CR, Wilde AA. Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families. *Circ Res*. 2003, 92, 976-983.

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*. 1998, 97, 1623-1631.

Verheijck EE, van Ginneken AC, Wilders R, Bouman LN. Contribution of Ltype Ca^{2+} current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am. J. Physiol*. 1999, 276, H1064-1077.

Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ, Bouman LN. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res*. 2001, 52, 40-50.

Verheijck EE, Wilders R, Bouman LN. Atrio-Sinus Interaction Demonstrated by blockade of the Rapid Delayed Rectifier Current. *Circulation*. 2002, 105, 880-885.

Vilaine JP. The discovery of the selective I(f) current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Pharmacol Res*. 2006, 53, 424-434.

Vinogradova TM, Zhou YY, Bogdanov KY, Yang D, Kuschel M, Cheng H, Xiao RP. Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ. Res*. 2000, 87, 760-767.

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

Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001, 411, 805-810.

Wakimoto H, Maguire CT, Kovoov P, Hammer PE, Gehrmann J, Friedman JK, Berul CI. Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res*. 2001, 50, 463-473.

Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*. 1996, 348, 7-12.

Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ Res*. 1996, 79, 79-85.

Wang DW, Viswanathan PC, Balser JR, George AL Jr, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation*. 2002, 105, 341-346.

Wasserstrom JA, Aistrup GL. Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 289, H1781-1793.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J *et al*. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002, 420, 520-562.

Weiergraber M, Henry M, Sudkamp M, de Vivie ER, Hescheler J, Schneider T. Ablation of Ca(v)2.3 / E-type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system. *Basic Res Cardiol*. 2005, 100, 1-13.

Wettwer E, Grundke M, Ravens U. Differential effects of the new class III antiarrhythmic agents almokalant, E-4031 and D-sotalol, and of quinidine, on delayed rectifier currents in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 1992, 26, 1145-1152.

Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron*. 1998, 20, 103-114.

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

Wickman K, Pu WT, Clapham DE. Structural characterization of the mouse Girk genes. *Gene*. 2002, 284, 241-250.

Wilders R, Jongsma HJ, van Ginneken AC. Pacemaker activity of the rabbit sinoatrial node. A comparison of mathematical models. *Biophys. J*. 1991, 60, 1202-1216.

Winslow E, Marshall RJ, Hope FG. Comparative effects of fast-and slow ion channel blocking agent on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1983, 5, 928-936.

Wolf CM, Pizard A, Burgon P, Branco D, Fishman GI, Stewart CL, Seidman CE, Seidman JG, Berul CI. Partial lamin A/C deficiency causes cardiac conduction system disease due to

apoptotic cell death in a laminopathy mouse model. *Heart Rhythm Society. NASPE*, 2006, P4-14. Abstract.

Wolf CM, Berul CI. Inherited conduction system abnormalities--one group of diseases, many genes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006, 17, 446-455.

Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG. Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994, 91, 9659-9663.

Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res*. 1999, 85, 623-633.

Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Ibutilide, a methanesulfonanilide antiarrhythmic, is a potent blocker of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ current (I_{Kr}) in AT-1 cells. Concentration-, time-, voltage-, and use-dependent effects. *Circulation*. 1995, 91, 1799-1806.

Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, Shibata EF. Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res*. 2002, 90, 443-449.

Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101, 1051-1056.

Yuan W, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol*. 1994, 267, H982-993.

Yusuf S and Camm AJ. The sinus tachycardias. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2005, 2, 44-52.

Zannad F, Radauceanu A. Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure. *Heart Fail Rev*. 2005, 10, 71-78.

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.* 2000, 279, H397-421.

Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS, Chiamvimonvat N. Functional Roles of Cav1.3 ($\alpha 1D$) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ. Res.* 2002, 90, 981-987.

Zhang Z, He Y, Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Zhang Q, Glatzer KA, Xu Y, Shin HS, Low R, Chiamvimonvat N. Functional roles of Cav1.3 ($\alpha 1D$) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation.* 2005, 112, 1936-1944.

Zicha S, Tsuji Y, Shiroshita-Takeshita A, Nattel S. Beta-blockers as antiarrhythmic agents. *Handb Exp Pharmacol.* 2006, 171, 235-266.

Résumé

MODÈLES MURINS EN RYTHMOLOGIE EXPÉRIMENTALE

L'activité électrique cardiaque prend naissance dans le nœud sinusal et se propage au myocarde contractile grâce au tissu de conduction. Le travail exposé dans cette thèse démontre le rôle de deux sous-unités de canaux ioniques dans l'automatisme des cellules sinusales et la conduction de l'influx électrique dans le cœur, grâce à l'utilisation de modèles murins. Le premier confirme *in vivo* l'hypothèse selon laquelle le canal calcique de type T, Cav3.1, participe à l'automatisme du nœud sinusal et démontre son implication dans la conduction auriculo-ventriculaire (AV) de l'influx électrique. Dans un second, l'invalidation du canal sodique Na_v1.5 (Scn5a^{+/-}) conduit à une dysfonction sinusale, des troubles de conduction AV et intra-ventriculaires identiques à ceux observés chez des patients porteurs de mutations du gène SCN5A. Ce modèle reproduit fidèlement l'hétérogénéité phénotypique existant chez les patients, suggérant l'importance de gènes modulateurs ou de l'environnement dans le phénotype des maladies génétiques. Enfin, la modulation du rythme constituant un enjeu majeur en thérapeutique cardiaque, nous avons montré que l'inhibition chronique des canaux *pacemaker* HCN induisait un remodelage ionique sinusal mais avait peu d'effet sur l'expression des canaux ioniques dans le ventricule chez la souris.

Mots clefs : automatisme cardiaque – conduction auriculo-ventriculaire – canaux ioniques – SCN5A – bradycardie

Abstract

MOUSE MODELS IN EXPERIMENTAL RYTHMOLOGY

Cardiac impulse originates from the sinus node and propagates through the cardiac conduction system to depolarise atrial and ventricular myocardium. The work exposed herein reveals the implications of two ion channel subunits in sinus node automaticity and in cardiac electrical conduction by the use of mouse models. The first model confirms the hypothesis implicating the calcium channel subunit Ca_v3.1 in sinus node automaticity, and shows its implication in atrioventricular (AV) conduction. The second model shows that heterozygous invalidation of Na_v1.5 sodium channel subunit (Scn5a^{+/-} mice) induces sinus node dysfunction, impaired AV conduction and delayed intramyocardial conduction. These cardiac abnormalities are similar to the phenotype observed in patients with SCN5A mutations. Moreover, Scn5a^{+/-} mice showed phenotype heterogeneity, just as in patients, revealing the importance of modulator genes or environment in the phenotype of genetic disorders. Finally, as cardiac rhythm modulation is of major interest in cardiac therapeutics, we have shown that chronic inhibition of HCN channels induces a complex ionic remodelling in the sinus node, but has little impact on ion channel expression in the mouse ventricle.

Keywords : cardiac automaticity – atrioventricular conduction – ion channels – SCN5A – bradycardia