UNIVERSITÉ DE NANTES – UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE – BIOLOGIE
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

Année 2010

TROUBLES DU RYTHME CARDIAQUE DANS LES MODÈLES MURINS TRANSGÉNIQUES

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Département de Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Khai LE QUANG

Le 07 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Dr. Stanley NATTEL, Institut de Cardiologie de Montréal
Dr. Flavien CHARPENTIER, Institut du Thorax/INSERM U915
Dr. Eric THORIN, Institut de Cardiologie de Montréal
Dr. Joël NARGEOT, Institut de Génomique Fonctionnelle, INSERM U611
Dr. René CARDINAL – Département de Pharmacologie, Université de Montréal

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à (1) l'institut du thorax, Unité 915 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) de Nantes au sein du groupe de Rythmologie expérimentale et transgénèse, sous la direction du Dr Flavien Charpentier, Directeur de Recherche INSERM ; et (2) Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, au sein du Laboratoire de Dr Stanley Nattel, Faculté de Médecine, Professeur de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

J'adresse tout particulièrement aux Dr. Flavien Charpentier et Dr. Stanley Nattel mes plus vifs remerciements pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée, leurs conseils précieux, leurs très grandes disponibilités et pour leurs qualités humaines et scientifiques. Je leur suis également très reconnaissant pour tout le temps qu'ils ont passé à mes côtés.

Je remercie respectueusement le Dr Eric Thorin, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, et le Dr Joël Nargeot, Directeur de Recherche à l'INSERM U611, Professeur de l'Université de Montpellier, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail.

Je suis reconnaissant envers le Dr René Cardinal, Professeur à l'Université de Montréal, pour sa participation à mon comité de thèse ainsi qu'au jury de cette thèse, et pour le temps qu'il a accordé à ce travail.

Je suis également très reconnaissant envers notre regretté Professeur Denis Escande, ancien Directeur du laboratoire INSERM U533, pour m'avoir initié à la recherche biomédicale à Nantes, et pour m'avoir aidé et conseillé au cours des années passées au sein de son laboratoire.

J'exprime également toute ma gratitude à Monsieur André Marette, Directeur de Recherche de l'Équipe de Recherche sur les complications cardiovasculaires du diabète des IRSC à l'Université Laval, Québec, Canada, pour son accueil et pour son aide lors de la recherche de mon stage post-doctoral.

Table de matière

Page

Chapitre 1: Introduction

Chapitre 2: Méthodes

Chapitre 3: Résultats

Index des illustrations

Liste des figures

Tableaux

Liste des abréviations

4-AP	4-aminopyridine
AC	Adénylate cyclase
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHA	American Heart Association
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
APD	Durée du potentiel d'action
ARNm	Acide ribonucléique messager
AV	Auriculo-ventriculaire
BAVc	Bloc auriculo-ventriculaire complet
CAMK	Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase
CEC	Couplage excitation-contraction
CICR	Calcium induced calcium release
Cx	Connexine
CPVT	Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique
CT	Crista terminalis
DAD	Delay after depolarization
DAVD	Dysplasie arythmogène ventriculaire droite
DD	Dépolarisation diastolique
DHPs	Dihydropyridines
DSP	Desmoplakine
DTDVG	Diamètre télédiastolique du VG
DTSVG	Diamètre télésystolique du VG
EAD	Early after depolarization
ECG	Electrocardiogramme
ERG	*Ether à gogo* related gene
ES	Cellule souche embryonnaire

FA	Fibrillation auriculaire
FE	Fraction d'éjection
FR	Fraction de raccourcissement
HCN	Hyperpolarization cyclic nucleotides activated channels
IC	Insuffisance cardiaque
ILK	Integrin linked kinase
IP	Injection intrapéritonéale
IVS	Septum interventriculaire
KO	Knock out
LVDS	Surface du VG en diastole
NCX	Echangeur Na^{+}/Ca^{2+}
Nœud AV	Nœud auriculo-ventriculaire
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Potentiel d'action
PCR	Polymerase chain reaction
PDM	Potentiel diastolique maximal
PKA	Protéine kinase A
Pkp	Plakophiline
PLB	Phospholambane
PR	Potentiel de repos
PRA	Période réfractaire absolue
PRE	Période réfractaire effective
PREA	Période réfractaire effective auriculaire
PREAV	Période réfractaire effective du nœud AV
PREV	Période réfractaire effective ventriculaire
PRR	Période réfractaire relative
PW	Point de Wenckebach
RF	Radiofréquence
RS	Réticulum sarcoplasmique
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
RyR	Récepteur à la ryanodine

SA	Nœud sinusal (sino-atrial node, en anglais)
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase
SNA	Système nerveux autonome
TdP	Torsade de pointes
TTX	Tetrodotoxine
TV	Tachycardie ventriculaire
VG	Ventricule gauche
WT	Wild type

Avant propos

Les maladies cardiovasculaires restent encore une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés aussi bien que dans les pays en voie de développement. Les maladies du cœur regroupent les problèmes de santé qui affectent la structure et la fonction cardiaque. Les causes en sont multiples. Le cœur possède son propre circuit électrique qui permet de synchroniser les contractions des oreillettes et des ventricules, ce qui permet au sang d'être pompé et expulsé de la façon la plus efficace vers l'ensemble des organes du corps. Pour cela, le stimulateur (ou le pacemaker, autrement dit en anglais) naturel du cœur, le nœud sinusal, doit fonctionner normalement afin d'envoyer des impulsions électriques régulières vers le système de conduction qui déclenche par la suite le couplage contraction-relaxation du muscle cardiaque.

Les canaux ioniques sont des petites protéines qui traversent la membrane de chacune des cellules cardiaques. Elles contrôlent de façon sélective le passage des ions (Na^+, K^+ et Ca^{2+} par exemple) à travers celle-ci et par conséquent déterminent le potentiel de membrane des cellules, contribuant à la propagation organisée du signal électrique cardiaque. Les canaux ioniques sont ainsi des acteurs essentiels à la contraction organisée et efficace de chacune des chambres cardiaques. Dans le cas où la fonction des canaux ioniques est altérée, la fonction du cœur peut être perturbée. En effet, le type de canal ionique altéré et sa distribution va conditionner la forme spécifique des troubles du rythme observés. Par exemple, la fréquence cardiaque peut être diminuée (bradycardie) ou augmentée (tachycardie), les deux phénomènes pouvant conduire au développement d'un trouble du rythme sévère comme la fibrillation ventriculaire, une cause majeure de mort subite. Dans ce contexte, les travaux de recherche fondamentaux sur des modèles murins transgéniques sont réalisés afin de mieux comprendre la genèse des arythmies et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mon travail de thèse en cotutelle France-Québec avait pour objectif d'appliquer des technologies clinique utilisées chez l'Homme (comme l'enregistrement de l'ECG de surface en télémétrie, l'exploration électrophysiologique endocavitaire, l'ablation par radiofréquence…) dans la recherche en rythmologie chez la souris. Ces travaux de thèse ont été réalisé dans le contexte d'études des effets de la manipulation génétique sélective sur les troubles du rythme et de la conduction: i) la création d'un pacemaker biologique (afin de remplacer le pacemaker électronique) ii) l'identification des rôles du canal calcique de type T au niveau ventriculaire (dans des modèles de bloc auriculo-ventriculaire complet ou de d'infarctus du myocarde) et iii) l'invalidation cardio-spécifique de l'expression de la kinase liée aux intégrines.

RÉSUMÉ et MOTS CLÉS

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'hypertrophie cardiaque est un processus de remodelage provoqué par une surcharge de travail du muscle cardiaque afin de mieux répondre à la demande de l'organisme. Bien que bénéfique à court terme, une hypertrophie trop accentuée conduira à long terme, à une insuffisance cardiaque. L'hypertrophie est associée à un remodelage électrique qui conduit généralement à un allongement du potentiel d'action, une des causes des arythmies ventriculaires et de la mort subite. Généralement, le mécanisme causal est la fibrillation ventriculaire, un trouble du rythme irréversible dont les mécanismes sont complexes et méconnus. Si les conséquences fonctionnelles *in vitro* des mutations génétiques ou du remodelage ionique sont relativement simples à étudier ou à prévoir, leur rôle dans les mécanismes des troubles du rythme *in vivo* sont plus difficiles à appréhender. Parmi les nombreux modèles animaux développés pour la recherche sur les troubles du rythme, la souris est de plus en plus utilisée en raison de notre capacité à muter, invalider ou sur-exprimer les gènes d'intérêt chez ces animaux. L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques en physiopathologie cardiaque, en particulier dans la survenue des troubles du rythme *in vivo*. Ces travaux ont permis d'améliorer notre connaissance du rôle des anomalies génétiques impliquant des canaux ioniques et du remodelage ionique dans la physiopathologie des troubles du rythme et pourrait ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement anti-remodelage cardiaque et la prévention de la mort subite.

Mots-clés : souris transgénique, remodelage cardiaque, infarctus du myocarde, bloc auriculo-ventriculaire, fibrillation auriculaire, tachycardie ventriculaire, canaux ioniques, mort subite.

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the world each year. If no action is taken to improve cardiovascular health and current trends continue, WHO estimates that 25% more healthy life years will be lost to cardiovascular disease globally by 2020. Cardiac hypertrophy is the consequence of an excessive workload of the heart muscle leading to cardiac remodeling process. As the workload increases, the ventricular walls grow thicker, lose elasticity and eventually may fail to pump with as much force as a healthy heart. Furthermore, hypertrophied myocardium is not physiologically normal and may confer a predisposition to potentially fatal arrhythmias. Generally, the causal mechanism is ventricular fibrillation, a cardiac rhythm disorder which is irreversible but the pathophysiological mechanisms are complex and poorly understood. The functional consequences of mutations or ionic remodeling are relatively simple to study *in vitro*, but their role in the pathophysiology of arrhythmias in vivo is more difficult to grasp. Among the different animal models developed in cardiac arrhythmias research, the mouse is increasingly used because of our ability to mutate, knock-out or over-express genes of interest. The objective of my thesis was to study the role of ion channels in physiology as well as cardiac pathophysiology, particularly in the involvement of the occurrence of cardiac arrhythmias *in vivo*. This thesis will improve our understanding of the role of genetic abnormalities involving ionic remodeling in the pathogenesis of the heart and may also open new therapeutic perspectives in the treatment of cardiac remodeling as well as sudden cardiac death.

Key-words: transgenic mouse, cardiac remodeling, myocardial infarction, complete heart block, atrial fibrillation, ventricular tachycardia, ionic channels, sudden death.

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION

Chapitre 1 : INTRODUCTION

1.1 Rappels d'électrophysiologie cardiaque :

Dans les cellules excitables, le potentiel membranaire peut-être défini en deux principaux états : le potentiel de repos (PR) et le potentiel d'action (PA). Dans le cas des cardiomyocytes, PR et PA alternent au cours du cycle cardiaque. Le PR cardiaque possède une valeur comprise entre –60 et –90 mV. Le PR des cellules contractiles auriculaires et ventriculaires est stable. En revanche, le PR des cellules douées d'automatisme est instable, ce qui se traduit sur le tracé du potentiel en fonction du temps par une pente progressivement croissante dite pente de dépolarisation diastolique.

1.1.1 Les différentes phases du potentiel d'action

Pour décrire plus facilement le décours d'un PA et le PR au cours du temps, on distingue cinq phases numérotées de 0 à 4 (Figure 1). Les phases 0, 1, 2 et 3 appartiennent au PA : la phase 0 correspond à la dépolarisation lors de l'initiation du PA, la phase 1 est une phase de repolarisation précoce, la phase 2 correspond au plateau et la phase 3 à la repolarisation terminale. La phase 4 correspond au PR des cardiomyocytes ou à la dépolarisation diastolique des cellules douées d'automatisme.

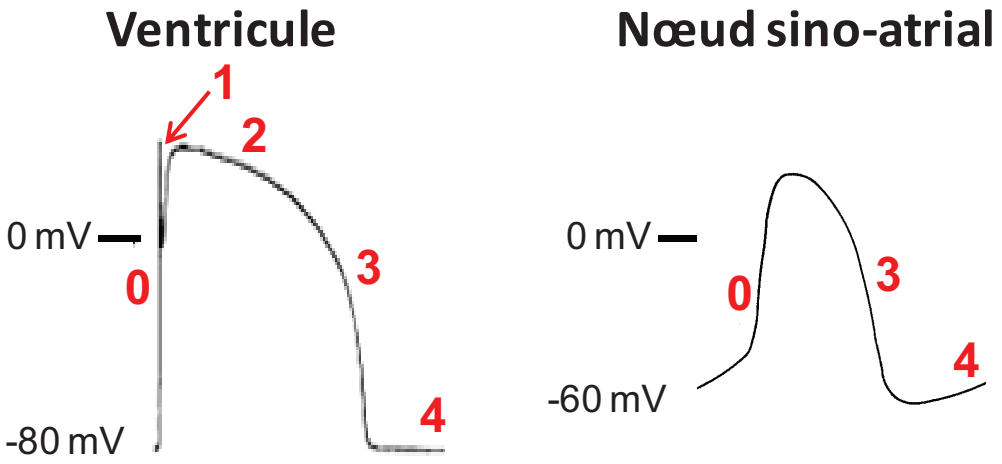

Figure 1 *: Représentation schématique de potentiels d'action du ventricule et du nœud sino-atrial. Les différentes phases des potentiels d'action sont numérotées en rouge.*

- **La phase 0,** ou phase ascendante du PA, correspond à une dépolarisation très rapide de l'ordre de la milliseconde, excepté pour les cellules nodales qui ont une phase 0 beaucoup plus lente. La vitesse de conduction dépend de l'amplitude du PA et de la variation de potentiel en fonction du temps (dVm/dt). On la caractérise par la dVm/dt maximale ou dVm/dt max (200 à 300 V/s). On appelle *overshoot* la partie de la phase 0 comprise entre le potentiel zéro et le sommet du PA. Cette phase résulte de l'entrée de sodium (I_{Na}) dans les cellules myocardiques et de Purkinje ou de l'entrée de calcium (I_{Ca}) dans les cellules du nœud sino-atrial (SA, ou nœud sinusal) et du nœud auriculo-ventriculaire (AV).
- **La phase 1** (appelée pointe ou spike) correspond à la phase de repolarisation initiale rapide après l'*overshoot*, partie en générale positive et brève du PA, plus ou moins marquée selon les tissus cardiaques. Cette phase est due à un courant transitoire sortant voltage-dépendant : I_{to} (to : transient outward). Ce courant est subdivisé en deux composants : I_{to1} et I_{to2}, transportées à travers deux canaux distincts. I_{to1} est un courant potassique responsable de la plus grande partie de la phase 1 et est indépendant de la concentration intracellulaire en calcium mais sensible au bloqueur 4-aminopyridine (4-AP). I_{to2} est moins sensible au 4-AP mais est davantage Ca^{2+}-dépendant : si la concentration intracellulaire en calcium devient trop élevée, I_{to2} augmente. Cela raccourcit le PA et diminue l'entrée de calcium dans la cellule pendant la phase 2 (plateau) : la surcharge calcique intracellulaire se trouve ainsi réduite.
- **La phase 2** est la phase de plateau ou repolarisation lente. Cette phase est caractérisée par un plateau plus ou moins rectangulaire selon le tissu cardiaque et l'espèce animale (il est peu visible chez le rat ou la souris qui ont des PA ventriculaires triangulaires). Cette phase est une balance entre des courants entrants positifs (qui tendent à dépolariser la membrane) et des courants sortants positifs (qui tendent à repolariser la membrane) (figure 2). Le principal courant entrant positif est un courant calcique voltage-dépendant. Il existe plusieurs types de canaux calciques voltage-dépendants avec des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques différentes : L, T, N et P (ces deux derniers types N et P ont été décrits exclusivement sur des neurones). Dans le myocarde ventriculaire, les canaux calciques sont de type L, le courant

correspondant s'écrit donc I_{CaL}. Le canal de type L a un seuil d'activation plus positif que celui de type T et s'inactive lentement (L = long lasting ou longue durée) à la différence du type T (T = transient ou transitoire). Les canaux calciques de type T sont présents dans les cellules atriales, de Purkinje et nodales, mais généralement absent dans les cardiomyocytes ventriculaires. Le rôle du courant calcique est essentiel puisqu'il agit pour le cœur des mammifères comme déclencheur de la contraction en provoquant la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique, phénomène connu sous le nom de « Calcium-induced calcium release ». Le courant sortant positif est le courant potassique retardé – car il ne s'active que très lentement – I_K. Il comporte deux composantes principales : I_{Kr} (pour rapid) et I_{Ks} (pour slow). Une troisième composante, I_{Kur} (pour ultra-rapid), n'est pas retrouvée à l'étage ventriculaire chez l'homme. I_K est voltage-dépendant et présente une rectification dans le sens sortant (la conductance potassique gK augmente avec la dépolarisation de la cellule et donc accélère la repolarisation). Ce phénomène de rectification est une variation de la résistance, en fonction du potentiel, que présente la membrane au passage d'un courant ionique X. La rectification est dite dans le sens sortant lorsque la membrane laisse passer plus facilement le courant ionique X lorsqu'il est sortant que lorsqu'il est entrant. Inversement, une rectification dans le sens entrant favorise le passage du courant ionique X quand il est entrant et donc freine son passage quand il est sortant. La rectification qui caractérise certain canaux potassiques et calciques permet d'augmenter la vitesse de repolarisation de la membrane.

- **La phase 3** correspond à la repolarisation membranaire finale, I_{CaL} diminue (en raison de son inactivation), alors que I_K continue d'augmenter (en raison de sa lente activation) mais s'annule pour des potentiels inférieurs à -50 mV. Pour les potentiels inférieurs à -60 mV, le courant potassique à rectification entrante I_{K1} participe à la repolarisation (figure 2).
- **La phase 4** correspond au potentiel de repos qui est négatif, proche de -90 mV et donc de E_K, car la membrane est principalement perméable aux ions potassium à travers I_{K1}. Il existe une très faible perméabilité aux ions sodium à l'origine d'un courant sodique entrant dénommé courant de fond sodique $I_{b,Na}$ (b = background : fond). Dans les cellules du myocarde, cette phase 4 ne présente pas de pente, il n'y a pas

d'automatisme. Dans les cellules des nœuds et du réseau His-Purkinje, cette phase 4 est caractérisée par une dépolarisation diastolique spontanée liée, entre autres à l'activation du courant I_f.

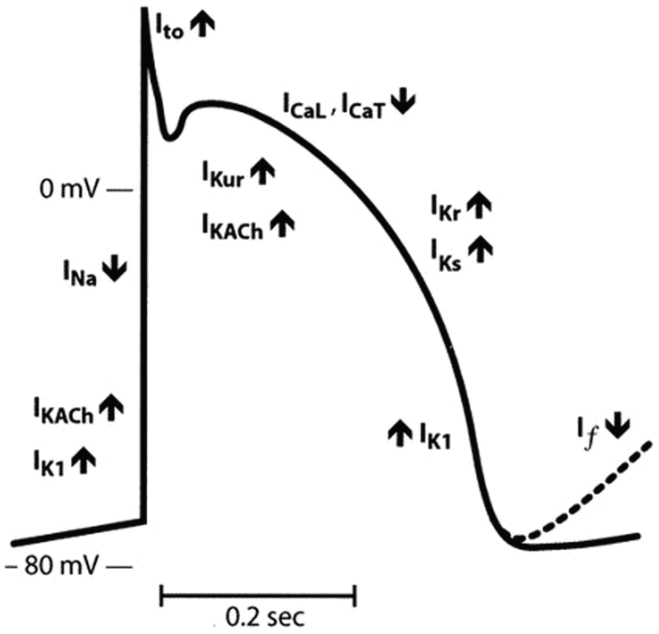

Figure 2 **:** *Représentation schématique d'un PA cardiaque et des principaux courants ioniques impliqués (Schram et al., 2002).*

1.1.2 Les périodes réfractaires

Il existe un intervalle de temps (compris entre le début du PA et environ la moitié de la phase 3) pendant lequel il est impossible de provoquer un nouveau PA, même anormal : cet intervalle est appelé période réfractaire absolue ou PRA (figure 3). Cette période est suivie par la période réfractaire relative (PRR) pendant laquelle un début de réponse peut être initié avec des intensités de stimulation élevées, se rapprochant peu à peu d'une valeur normale. On appelle période réfractaire effective (PRE) l'intervalle de temps au bout duquel on peut obtenir un PA propagé. Sa durée correspond à celle de la PRA plus environ la moitié de la PRR (figure 3). La détermination de la PRE consiste à appliquer dans un tissu (oreillette ou ventricule), après une dépolarisation basale, une excitation de plus en plus prématurée et à mesurer l'intervalle de temps au bout duquel cette excitation devient inefficace. Ainsi, le cœur étant entraîné par une stimulation régulière, tous les 8 battements est délivrée dans le tissu, par l'entremise du stimulateur,

une excitation anticipée (extrasystole) : c'est la méthode de l'extrastimulus. L'augmentation des périodes réfractaires est un indice d'altération cardiaque. De réalisation longue, la méthode de l'extrastimulus n'est pas toujours incluse dans les études électrophysiologiques, d'autant qu'en pratique les informations apportées par les intervalles de conduction et l'entrainement auriculaire rapide suffisent bien souvent. Complétant notre connaissance sur l'état des tissus cardiaques, les périodes réfractaires sont en revanche généralement prises en compte pour évaluer les effets électriques de médicaments.

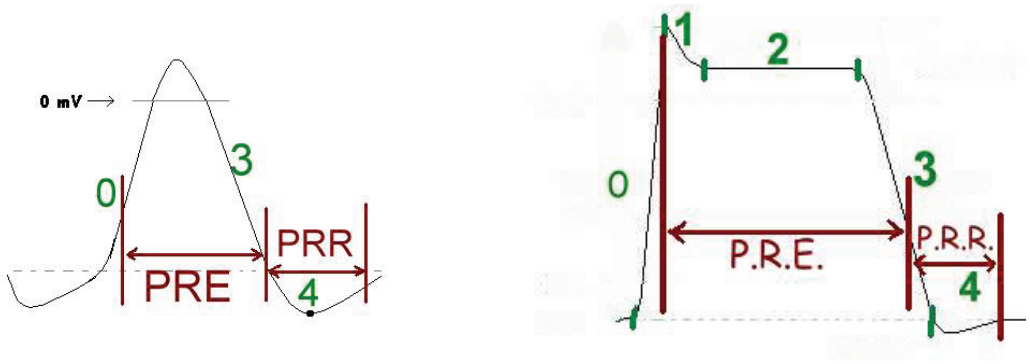

***Figure 3** : La période réfractaire des cellules nodales (à gauche) et des cellules musculaires (à droite)*

1.1.3 Genèse et conduction de l'influx électrique dans le cœur

Le PA cardiaque présente une grande diversité morphologique selon les tissus cardiaques, les espèces animales ou les conditions expérimentales. La figure 4 montre des PA enregistrés dans différents territoires cardiaques. Dans tous les cas, le PA se caractérise par une inversion transitoire du potentiel membranaire Vm : le milieu intracellulaire devient positif par rapport au milieu extracellulaire. Son amplitude totale est de l'ordre de 80 à 130 mV et sa durée est généralement comprise entre 100 et 200 ms pour un PA auriculaire et 200 à 400 ms pour un PA ventriculaire.

L'activité électrique cardiaque se propage de cellule en cellule à travers le myocarde et le tissu de conduction selon un cheminement déterminé (Figure 4). L'influx électrique naît de l'automatisme du nœud SA, se propage au myocarde auriculaire puis au nœud auriculo-ventriculaire AV où il est ralenti. Cet influx se propage ensuite aux

ventricules par le tronc du faisceau de His, ses branches droite et gauche puis le réseau sous-endocardique des fibres de Purkinje. L'expression d'une conduction normale sur l'ECG est visualisée par la succession de :

1. l'onde P de dépolarisation auriculaire (la repolarisation n'est pas visible),
2. l'intervalle PR ou PQ isoélectrique, qui représente le temps de conduction AV, c'est-à-dire la dépolarisation du nœud AV et du faisceau de His et ses branches,
3. le complexe QRS, dû à la dépolarisation ventriculaire,
4. le segment ST isoélectrique, qui correspond au plateau des PA (phase 2) et
5. l'onde T, qui correspond à la repolarisation terminale (phase 3).

L'ensemble QRS-T (dépolarisation et repolarisation ventriculaire) n'est finalement que la dérivée première (en fonction du temps) de la courbe monophasique du PA ventriculaire.

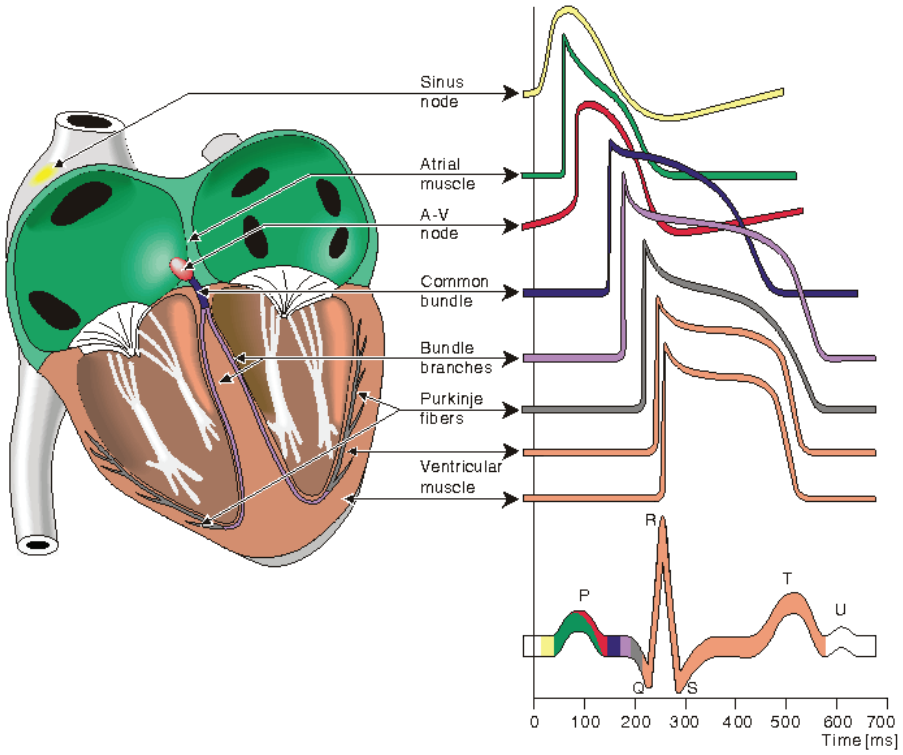

Figure 4 *: Représentation schématique des cavités et des voies de conduction cardiaque, de leurs potentiels d'action et de l'ECG de surface résultant de l'activité électrique de ces cellules (http://www.bem.fi/book/06/06.htm).*

Le nœud SA, situé à la jonction entre la veine cave supérieure et l'oreillette droite (figure 5A), possède une activité intrinsèque de dépolarisation automatique conférant au cœur un rythme intrinsèque. Le nœud sinusal est le pacemaker (en anglais pace = entrainement et maker = qui fait) ou entraineur cardiaque dominant. Les cellules du nœud AV, du faisceau de His et du réseau de Purkinje présentent également une activité automatique, plus lente que celle du nœud SA et pour le réseau His-Purkinje, de plus en plus lente au fur et à mesure que l'on s'éloigne du nœud AV. Si l'on détruit le nœud SA, les cellules du nœud AV ou du faisceau de His (pacemakers latents ou secondaires) prennent la relève à un rythme qualifié d'idioventriculaire (idio signifie propre à) beaucoup plus lent (15 à 40 bpm chez l'Homme).

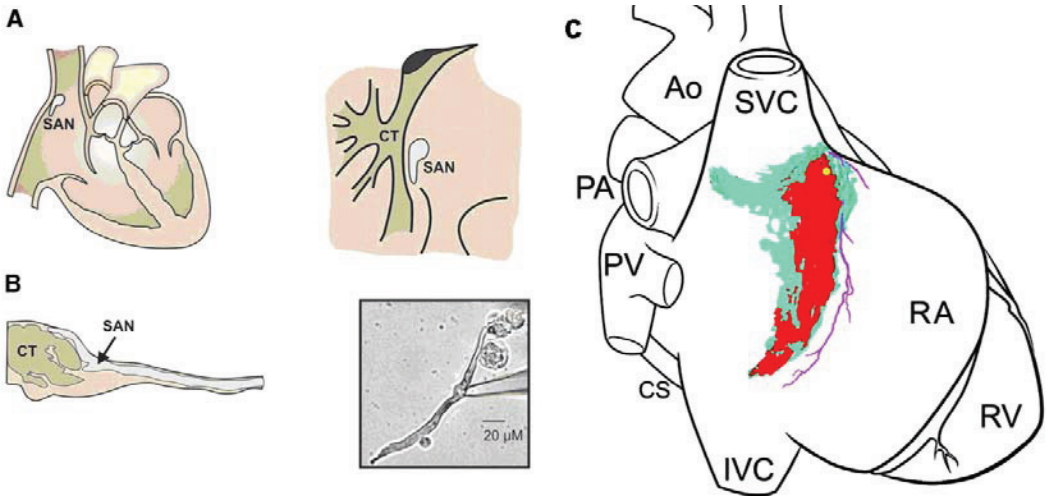

Figure 5*: **A**: Anatomie et localisation du nœud sinusal. SAN, nœud sino-atrial (gris); CT, crista terminalis. **B**: structure du nœud sino-atrial (à gauche; flèche) et la morphologie d'une cellule pacemaker isolée (à droite). (Biel et al., 2009). **C**: Représentation schématique de la localisation du nœud sino-auriculaire. Le point jaune est la localisation des activités spontanées (forte densité de cellule de type araignée), la partie de couleur rouge correspond à la surface du nœud SA, la partie bleue est la périphérie du nœud SA (Dobrzynski et al., 2005).*

L'activité spontanée est normalement déclenchée dans une petite zone du nœud SA située approximativement au centre du tissu. Les influx se propagent du centre vers la périphérie du nœud SA (figure 5C). Le centre du nœud sinusal est principalement occupé

par des cellules dominantes pour lesquelles la conduction intercellulaire est mauvaise. A l'inverse, lorsque l'on s'éloigne de la partie centrale du nœud sinusal, la vitesse de conduction augmente. La propagation est en fait asymétrique : les influx se dirigent préférentiellement vers la partie supérieure de la *crista terminalis*, mais sont bloqués dans une zone proche du septum auriculaire. Cette zone de blocage est fonctionnellement importante, car elle protège le nœud sinusal d'une source éventuelle d'arythmies auriculaires (Bleeker et al., 1982). Il n'existe pas de repère anatomique permettant de situer avec exactitude le centre de déclenchement de l'activité spontanée. Le seul critère actuellement reconnu est de repérer, grâce aux méthodes électrophysiologiques, la région nodale qui présente une activité spontanée ou le potentiel diastolique maximal (PDM) est le moins négatif et la pente de dépolarisation diastolique la plus prononcée. Cette région est généralement constituée d'une forte densité de cellules de type araignée (Wu et al., 2001).

L'exploration de la fonction sinusale a constitué pendant longtemps l'un des domaines principaux de l'exploration électrophysiologique endocavitaire. Ce nœud est composé de cellules d'origine musculaire, entourées d'une grande quantité de collagène et de fibroblastes en périphérie. Le développement des techniques de dissociation des cellules cardiaques viables a permis de mettre en évidence plusieurs types de cellules sinusales capables, une fois isolées, de battre spontanément. Deux formes sont classiquement décrites : en fuseau (spindle cell) et en araignée (spider cell). Dans ce dernier cas, les cellules présentent de multiples prolongements cytoplasmiques (Denyer et al., 1990).

Globalement, le PA des cellules du nœud SA est caractérisé par trois propriétés principales (Cho et al., 2003) : l'absence de PR stable avec un PDM faible (PDM ~ -50 à -60 mV ; figures 1), une dépolarisation diastolique spontanée et lente, jusqu'à un certain seuil à partir duquel se déclenche un nouveau PA, et une durée longue. Cette dépolarisation diastolique spontanée explique l'automatisme cardiaque. Les influx se propagent du centre vers la périphérie du nœud SA. Le centre du nœud sinusal est principalement occupé par des cellules dominantes pour lesquelles la conduction intercellulaire est mauvaise. A l'inverse, lorsque l'on s'éloigne de la partie centrale du nœud sinusal, la vitesse de conduction augmente. L'activation se propage ensuite aux

cardiomyocytes des oreillettes droite et gauche. La propagation est en fait asymétrique : les influx se dirigent préférentiellement vers la partie supérieure de la *crista terminalis*, mais sont bloqués dans une zone proche du septum auriculaire. Cette zone de blocage est fonctionnellement importante, car elle protège le nœud sinusal d'une source éventuelle d'arythmies auriculaires (Bleeker et al., 1982).

Le nœud AV est le pont unique du passage électrique entre les oreillettes et les ventricules. L'enregistrement par microélectrodes des potentiels transmembranaires a été réalisé sur des préparations de nœud AV de lapin à la fin des années 50. Matsuda et al. (1958), et Hoffman et al. (1958) rapportèrent, les premiers, les propriétés des PA du nœud AV et leur modification par l'acétylcholine. Il existe aussi des cellules à automaticité intrinsèque entourées de cellules transitionnelles en trois régions différentes : atrionodale (AN), nodale vraie (N) et nodale-hissienne (NH). Ces régions ont été désignées en se basant majoritairement sur les différences de morphologie du PA enregistré dans chacune d'elle. Le PA de la zone N est celui qui a la plus faible amplitude et la pente de dépolarisation en phase 0 la plus faible donc la conduction la plus lente. Les zones AN et NH ont des caractéristiques de PA intermédiaires entre le myocarde atrial et la zone N pour la zone AN et entre la zone N et les fibres du tronc du faisceau de His pour la zone NH.

La propagation passive ou électrotonique est d'autant meilleure que la résistance interne des fibres est plus faible. Or la résistance interne est d'autant plus importante que le diamètre des fibres est plus petit et que les nexus sont plus rares. Ainsi les cellules du nœud SA et du nœud AV, de petit diamètre et possédant peu de nexus, ont une résistance interne élevée, ce qui contribue, à côté des caractéristiques propres de leur PA, à rendre vulnérable la conduction à leur niveau. Au contraire les fibres du système de His-Purkinje, de gros diamètre et comportant de nombreux nexus, ont une conduction facilitée.

La vitesse de conduction est liée à l'amplitude et à la vitesse maximale d'ascension (Vmax) de la phase 0 du PA. Or, la Vmax est corrélée avec le niveau de potentiel membranaire (Em) au moment où le PA est généré : plus Em est élevé (plus négatif), plus la Vmax est rapide et plus la vitesse de conduction est grande. Donc les fibres du système His-Purkinje, très polarisées au repos, conduisent rapidement. Au

contraire, dans les cellules du nœud AV, partiellement dépolarisées au repos (réponses lentes), l'onde d'activation progresse lentement et le retard qu'elle prend rend compte de l'intervalle PR de l'ECG.

D'un point de vue électrophysiologique fondamental, les données retrouvées par différentes équipes sur des préparations de nœud AV de lapin ont montré que la phase 0 du PA était essentiellement sous la dépendance du courant calcique $I_{Ca,L}$ (Workman et al., 1999). Cette pente très lentement ascendante de la phase 0 du PA en particulier dans la zone N contribue à allonger l'intervalle PR pour favoriser le remplissage ventriculaire gauche.

1.2 Mécanismes de l'activité automatique

Les cellules nodales ne présentent pas de PR stable. A partir d'une valeur initiale d'environ -60 mV, la membrane se dépolarise lentement, ce qui se traduit sur le tracé par une montée progressive de la ligne de base (pente de dépolarisation diastolique) jusqu'à un certain seuil à partir duquel se déclenche un nouveau PA. Cette dépolarisation diastolique spontanée explique l'automatisme cardiaque. La technique de patch-clamp est devenue populaire dans la recherche des études des courants ioniques impliqués dans l'activité de pacemaker sur les cellules pacemaker individuelles (Irisawa et al., 1993). Différentes familles de canaux ioniques ont été décrites (Boyett et al., 2000).

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}, chacun d'entre eux étant généré par des canaux ioniques aux propriétés spécifiques (Figure 6). La repolarisation des cellules sinusales dépend de plusieurs courants potassiques distincts (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{KAch}...). La dysfonction du nœud SA cause des brady-arythmies qui sont associées avec la syncope mais rarement avec la mort subite (Rubenstein et al., 1972).

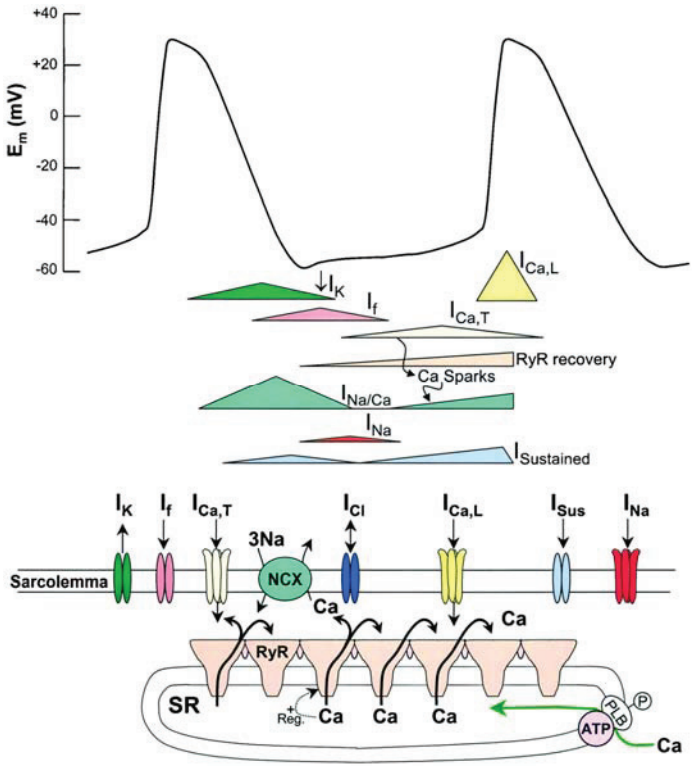

Figure 6 *: Les courants ioniques impliqués dans l'activité de pacemaker cardiaque. Plusieurs courants augmentent et/ou diminuent au cours de la dépolarisation diastolique des myocytes cardiaques (indiqué par des formes triangulaires) (Bers, 2002).*

1.2.1 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*, qui signifie bizarre). C'est un courant cationique mixte porté par les ions Na^+ et K^+. Toutefois, le flux principal à travers les canaux 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). I_f est activé par l'hyperpolarisation et non par la dépolarisation comme c'est le cas pour le courant sodique I_{Na} (Brown et al., 1979 ; DiFrancesco, 2006). L'étude en patch-clamp des propriétés des canaux I_f montre que le courant entrant qu'ils induisent est d'autant plus important que le potentiel de membrane est négatif, à partir d'une valeur seuil variant, selon les auteurs, entre -40 et -60 mV. Cette valeur reste cependant compatible avec la gamme de potentiels où se développe la phase de dépolarisation diastolique

(DiFrancesco, 1993). Le canal responsable du courant I_f appartient à la famille des canaux activés par l'hyperpolarisation et sensibles aux nucléotides cycliques intracellulaires. Ces canaux sont codés par les gènes HCN (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels) dont quatre isoformes, HCN1, HCN2, HCN3 et HCN4, ont été clonées. Dans le cœur, l'isoforme HCN4 est la forme majoritairement exprimée dans le nœud SA et les fibres de Purkinje alors que HCN2 est l'isoforme majeure dans le tissu ventriculaire (Bois et al., 2007). 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). L'expression de HCN4, dont la prédominance de l'expression a été confirmée dans le nœud SA humain (Thollon et al., 2007) serait donc corrélée à l'activité spontanée caractéristique des cellules cardiaques automatiques. Les ions césium, qui inhibent en grande partie I_f, ralentissent la phase de dépolarisation diastolique sans toutefois supprimer l'activité rythmique des cellules nodales. Le même résultat est obtenu par des inhibiteurs plus spécifiques, tels que l'ivabradine (S16257) ou la zatebradine (Thollon et al., 1994 ; Bois et al., 1996). Ces résultats indiquent que la contribution du courant I_f au déclenchement de la dépolarisation diastolique est présente, mais pas essentielle.

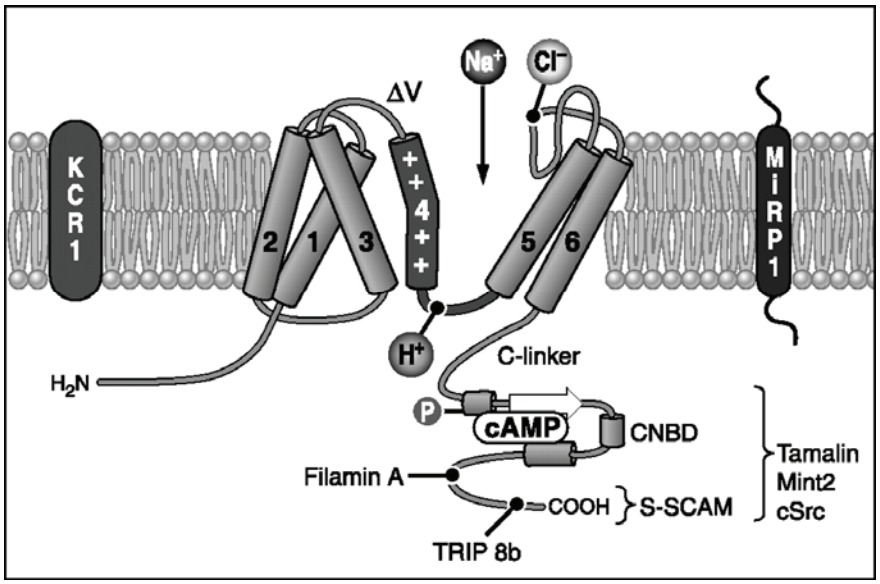

Figure 7 *: Régulation des canaux HCN par des protéines interagissant et les facteurs moléculaires faibles. Une seule sous-unité du complexe tétramérique du canal est affichée. Les protéines qui interagissent avec les canaux HCN et les facteurs moléculaires faibles qui régissent les canaux*

HCN sont indiquées. KCR1, MiRP1, Filamin A, TRIP8b, S-SCAM, Tamalin, Mint2, CSRC, Cl^-, H^+ interagissent avec des sites différents du canal comme indiqué. Le site de phosphorylation de tyrosine dans le C-linker est indiqué par un cercle avec un «P» (Biel et al., 2009).

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. Les hormones et neurotransmetteurs qui augmentent du niveau de l'AMPc facilitent l'activation d'I_f en induisant un déplacement de la dépendance au potentiel des canaux HCN vers des potentiels plus positifs, conduisant ainsi à une augmentation de l'amplitude d'I_f (Pape et al., 1989), et en accélérant la cinétique de l'ouverture de ces canaux (Biel et al., 2002 ; DiFrancesco et al., 1991). Le mécanisme principal par lequel les nucléotides cycliques régulent le canal If a été découvert par DiFrancesco et Tortora dans le début des années 1990 en utilisant des enregistrements des courants par la technique de patch excisé sur des cellules du nœud SA. Ce fut une grande surprise que, contrairement aux autres canaux ioniques qui sont régulés par l'AMPc (via la protéine kinase A (PKA)) par la phosphorylation de sérine ou de thréonine (Park et al., 2008 ; Schulz et al., 2008 ; Yao et al., 2005), les canaux I_f sont activés par l'AMPc indépendamment de toute phosphorylation (DiFrancesco et al., 1991). L'AMPc se fixe en effet sur des domaines de liaison aux nucléotides cycliques (Cyclic Nucletodide Binding Domains, CNBD) situés sur l'extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 7).

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.

1.2.2 Les canaux sodiques dépendant du potentiel

Les canaux sodiques dépendant du potentiel sont exprimés de façon variable dans les cellules pacemaker du nœud SA. 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 SA 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 PA. 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 déplacée vers des potentiels plus positifs par rapport au courant TTX-résistant, il participerait à la dépolarisation diastolique des cellules sinusales. L'expression de sous-unités neuronales des canaux sodiques, Nav1.1 et Nav1.3, dans le nœud sinusal de la souris concorde avec leur 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 généré par la sous-unité Nav1.5 dont l'expression n'a été détectée que dans les cellules de grande taille (périphériques) chez la souris (Lei et al., 2004). A faible concentration (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 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 ainsi 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 Navβ (-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 SA (Maier et al., 2003).

1.2.3 Canaux calciques dépendant du potentiel

Grâce à la technique de patch-clamp, Hagiwara et al. (1998) ont montré, dans les cellules sinusales du cœur de lapin, la présence de deux types de courant calcique : le courant calcique de type lent, I_{CaL}, ayant un seuil d'activation de -40 mV, et un courant calcique de type transitoire, I_{CaT}, qui s'inactive plus rapidement et plus complètement en fonction du temps et présente un seuil d'activation plus négatif, aux environs de -60 mV. Ces courants correspondent à deux familles distinctes de canaux : les canaux Ca^{2+} de type T et ceux de type L (Ono et al., 2005). Les canaux calciques lents de type L sont présents en grande quantité dans le tissu ventriculaire par rapport aux canaux T qui, eux, sont plus abondants dans l'oreillette et dans les tissus nodaux (Vassort et al., 2006).

Les canaux calciques possèdent des sous-unités canalaires comportant quatre domaines étant équivalent à une sous-unité α d'un canal potassique à 6 segments transmembranaires (figure 8). Utilisant une faible concentration d'ions nickel (40 μM), les auteurs ont bloqué I_{CaT} sans affecter I_{CaL}. Dans ces conditions, ils observent un ralentissement de la pente de dépolarisation diastolique, ce qui suggère une contribution du courant calcique de type T à cette phase. Depuis, la contribution du courant calcique I_{CaT} à la dépolarisation diastolique de cellules cardiaques a été confirmée (Zhou et al., 1994). Ces canaux constituent la voie principale d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules pacemaker. Parmi les trois gènes décrits comme codants un canal calcique de type T fonctionnel, les gènes Cav3.2 et surtout Cav3.1 sont les principaux responsables de son expression dans les cellules automatiques cardiaques alors que le gène Cav3.3 ne semble pas y être transcrit (Couette et al., 2006 ; Mangoni et al., 2006). La discrimination entre la participation de l'une ou l'autre de ces sous-unités au courant I_{CaT} peut être faite dans certaines conditions grâce à leur sensibilité différentielle aux ions Ni^{2+}. Les canaux Cav3.1 sont moins sensibles au blocage par les ions Ni^{2+} (IC50=216 μM) que les canaux Cav3.2 (IC50=13 μM) (Lee et al., 1999). Enfin ces canaux sont insensibles à la stimulation β-adrénergique et aux dihydropyridines (DHPs) contrairement aux canaux de type L.

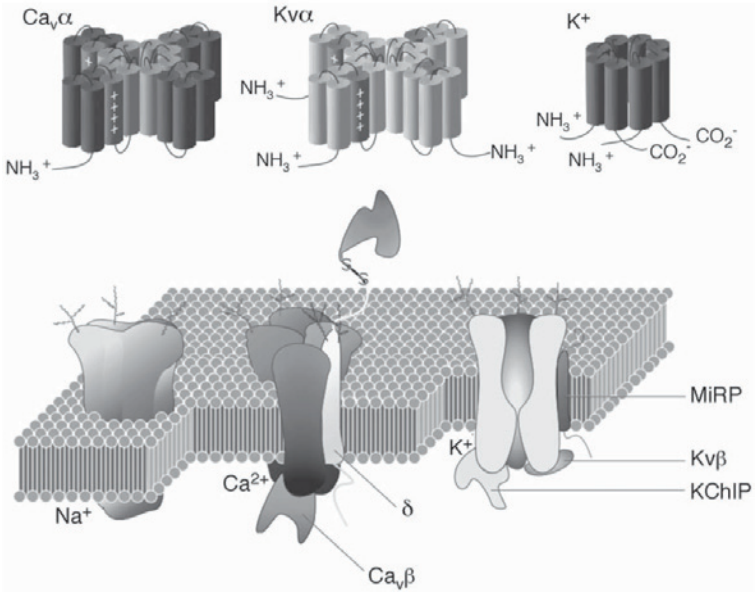

Figure 8 *: La composition moléculaire des canaux ioniques cardiaques : Na^+, Ca^{2+}, et les canaux K^+. En haut: Les quatre domaines d'une sous-unité α Cav (ou Nav) forment un canal Ca^{2+} (ou Na^+) monomérique, tandis que quatre sous-unités α se combinent pour former des canaux potassiques tétramériques Kv ou Kir. En bas: Schéma illustrant la localisation des différentes sous-unités accessoires (Nerbonne et Kass, 2003).*

Le courant calcique de type T joue un rôle important dans le développement et la différenciation cardiaque chez différentes espèces durant les phases embryonnaire et néonatale (Furukawa et al., 1992, Ferron et al., 2002). De façon intéressante, les études précédentes sur le remodelage ventriculaire ont montré une réexpression du courant calcique de type T dans différents modèles comme chez le chat (Nuss et al., 1993) et le rat (Martinez et al., 1999, Huang et al., 2000, Izumi et al. 2003). Les études antérieures montrent que les bloqueurs du courant calcique de type T réduisent le remodelage cardiaque post-IDM (Sandmann et al., 2001), cependant, ces bloqueurs d'I_{CaT} présentent des effets non-spécifiques sur d'autres courants ioniques (Fareh et al., 2001 ; De Paoli et al., 2001 ; Perchenet et al., 2000 ; Chouabe et al., 2000 ; McNulty et al., 2004).

Les canaux calciques de type L sont largement exprimés dans les tissus cardiaques. Le rôle fondamental de ces canaux réside dans l'initiation de la contraction myocardique par le mécanisme de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique par le calcium (calcium-induced calcium release, (CICR)). 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. Les canaux Ca^{2+} de type L sont sensibles aux dihydropyridines (DHPs) antagonistes comme la nifédipine, et agonistes, comme le BayK-8644 (Mangoni et al., 2006).

Ces canaux sont constitués par une sous-unité α1 centrale, formant le pore, associée à différentes sous-unités accessoires (α2-δ, β et γ). A ce jour, quatre sous-unités α1 ont été clonées, constituant la famille des Cav1.X. Seules Cav1.2 et Cav1.3 sont exprimées dans le système cardiovasculaire, la sous-unité Cav1.2 étant le déterminant moléculaire majoritaire d'I_{CaL}. La sous-unité Cav1.3, après avoir été considérée comme étant spécifique des neurones et des cellules neuroendocrines, a été identifiée dans l'oreillette et le nœud SA (Mangoni et al., 2006). Cette sous-unité forme des canaux qui ont un seuil d'activation plus négatif et une sensibilité aux DHPs plus faible que ceux formés à partir de la sous-unité Cav1.2. Par ailleurs, leur cinétique d'inactivation est plus lente que celle des canaux Cav1.2.

Dans le nœud SA, 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 CaM kinase II (CaMKII) activée par le complexe calcium/calmoduline (Petit-Jaques 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_{CaL} (Yuan et al., 1994 ; Xiao et al., 1994 ; Dzhura 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).

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 la 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).

1.2.4 Les canaux potassiques

L'activation du courant potassique dit « retardé » joue un rôle importante dans la repolarisation du PA du nœud SA. 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 transitoire sortant (I_{to}). Ces courants sont responsables de la repolarisation du PA.

Dans les cellules pacemaker isolées du nœud SA, 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 (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 le canal ERG (ether-à gogo related gene, codé par *KCNH2*) homologue au canal ether-a-go-go identifié chez *Drosophila melanogaster*.

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 (Lohrmann et al., 1995 ; Bosch et al., 1998). 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 SA (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 la souris knockout $KCNQ1^{-/-}$ et $KCNE1^{-/-}$ (Casimiro et al., 2001 ; Kupershmidt et al., 1999 ; Cho et al., 2003).

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 SA, $I_{to,f}$ 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 SA (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, Kv1.4 (gène *KCNA4*), abolit $I_{to,s}$ chez la souris (London et al., 1998). $I_{to,f}$ est généré par l'association en hétéromultimères des sous-unités α, Kv4.2 et Kv4.3 (codées respectivement par *KCND2* et KCND3) et est modulé 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} (*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 connue dans le nœud sinusal. Dans le ventricule, le courant $I_{K,slow}$ est généré par les sous-unités Kv1.5 et Kv2.1 codées respectivement par les gènes *KCNA5* et *KCNB1*. Chez l'homme, seule la sous-unité Kv1.5 existe et elle est majoritairement exprimée dans l'oreillette (Li et al., 1996).

1.2.5 Les courants de fond

Comme pour la plupart des cellules excitables, les cellules du nœud SA possèdent un courant de fond qui est la résultante de plusieurs composantes. Contrairement au courant de fond des myocytes auriculaires, ventriculaires et des cellules de Purkinje, celui des cellules nodales ne contient pas de composante I_{K1}, courant potassique responsable du maintien du potentiel de repos à des valeurs négatives (entre -90 et -80 mV) proches du potentiel électrochimique des ions potassium (Irisawa et al., 1993 ; Bois et al., 1990 ; Nakayama et al., 1984 ; Noma et al., 1984). Le courant de fond des cellules nodales est généré principalement par la pompe sodium/potassium (Na/K), par l'échangeur sodium/calcium (Na/Ca) et par une composante sodique.

La pompe Na/K induit constamment un courant net sortant, qui ne peut donc pas intervenir dans la dépolarisation diastolique. En fait, ce courant tendrait à stabiliser l'activité de la cellule nodale en limitant les effets dépolarisants des composantes entrantes du courant de fond (Noma et al., 1974 ; Sakai et al., 1996).

L'échangeur Na/Ca, dont l'activité a été étudiée sur de nombreuses préparations cardiaques, est également de nature électrogénique : trois ions sodium sont transférés d'un côté de la membrane pour un ion calcium de l'autre côté (Kimura et al., 1986). Ce courant d'échange NCX, se présente comme la composante dominante du courant de fond entrant qui favorise le déclenchement de l'activité spontanée (Pogwizd et al., 2001 ; Sanders et al., 2006).

Une composante de courant de fond de nature sodique a été mise en évidence dans les cellules nodales du cœur de lapin, de rat, de cobaye ou de souris (Shinagawa et al., 2000 ; Guo et al., 1995-1997). Ce courant sodique maintenu dépendant du potentiel, nommé I_{st} (pour *sustained current*) présente une pharmacologie particulière qui le rapproche plus des canaux calciques (sensibilité aux DHPs et aux ions divalents) que sodiques (insensibilité a la TTX) (Mitsuiye et al., 1999 ; 2000). 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 la stimulation β-adrénergique.

1.3 Couplage excitation-contraction du muscle cardiaque

Le couplage excitation-contraction (CEC) est une propriété des cellules musculaires qui regroupe l'ensemble des processus assurant la transformation électrique (PA) en un signal intracellulaire qui permet la contraction de la cellule (figure 9).

Le tubule T (pour tubule transverse) est une invagination du sarcolemme, permettant la propagation du PA jusqu'au cœur de la cellule. Les tubules T sont repartis régulièrement et forment un réseau continu et ramifié au sein de la jonction de la bande A et la bande I des sarcomères. La membrane du tubule T contient des protéines-clés du CEC : le récepteur aux dihydropyridine (DHPR) ou canal calcique de type L ainsi que l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX).

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un compartiment intracellulaire correspondant, dans les cellules musculaires striées, au réticulum endoplasmique qui doit sa terminologie à sa spécialisation dans le stockage et la libération du Ca^{2+}.

La juxtaposition d'un tubule T et d'une citerne terminale du RS jonctionnel forme une structure caractéristique appelée diade. C'est un espace restreint qui garantit une communication fonctionnelle entre les DHPR et le récepteur à la ryanodine (RyR). Les

RyR sont exprimés sous trois isoformes : RyR1 (muscle squelettique), RyR2 (cœur et muscle lisse) et RyR3 (cerveau et certains muscles lisses) (Fill et al., 2002).

RyR2 est un homotétramère (565 kDa par sous-unité) : chaque sous-unité est formée d'une large partie cytoplasmique N-terminale appelée « pied » et de quatre segments transmembranaires en partie C-terminale formant le pore du canal. Ce canal est considéré comme un complexe macromoléculaire en raison de ces multiples interactions dans la région du pied avec des protéines régulatrices. Chaque sous-unité interagit avec une immunophiline FKBP12.6, une protéine kinase A (PKA) et ses sous-unités régulatrices (Marx et al., 2000), une protéine d'ancrage mAKAP (muscle A-kinase-anchoring protein), une protéine phosphatase 1 (PP1), une protéine phosphatase 2A (PP2A) et une phosphodiesterase (PDE4) (Lehnart et al., 2006).

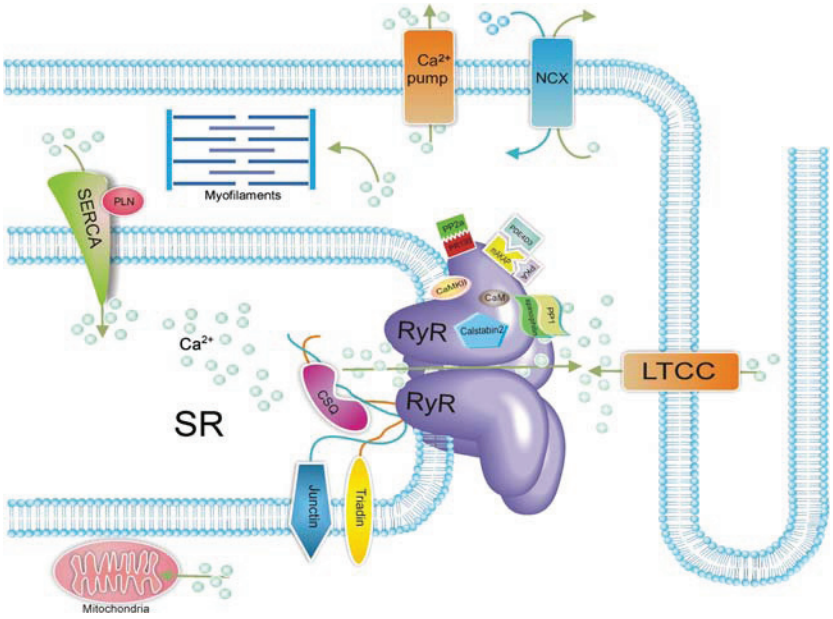

Figure 9 *: Le couplage excitation - contraction cardiaque. Le calcium entré via $I_{Ca,L}$ active RYR2 qui conduit à la libération du réticulum sarcoplasmique (RS) de Ca^{2+} dans le cytosol où le Ca^{2+} se lie aux myofilaments conduisant à un raccourcissement de la cellule et de la contraction cardiaque. Le Ca^{2+} est ensuite recapté dans le SR par SERCA2a et sorti de la cellule par l'échangeur sodium-calcium et la pompe Ca^{2+} plasmiques. RYR2 est un homotétramère régulé par de nombreuses protéines (Kushnir et al., 2010).*

CaMKII (Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase II) associe, phosphoryle et régule l'activité des RyR cardiaques (Witcher et al., 1991). Junctine, triadine, et calséquestrine forment un complexe avec la partie C-terminale de RyR, qui semble aussi participer à la régulation de l'activité du RyR. La Calséquestrine, à faible affinité, possède une grande capacité de régulation du Ca^{2+} local près du pore des RyR et peut également moduler directement l'activité des RyR (Zhang et al., 1997 ; Györke et al., 2008).

Le recaptage du Ca^{2+} dans le RS lors de la relaxation s'effectue par des pompes calciques appelées SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase). Il existe douze isoformes codées par trois gènes (SERCA 1, 2, 3) (Bers, 2002). Le gène SERCA2 exprimé dans le cœur, donne naissance à trois isoformes : 2a, 2b, 2c. Cependant, dans les cardiomyocytes sains, SERCA2a est la principale isoforme exprimée. L'activité de SERCA2a est régulée par la phosphorylation d'une protéine associée, le phospholamban (PLB) (Koss et al., 1996). Le PLB est un homopentamère de 52 acides aminés qui, lorsqu'il est déphosphorylé, se lie au domaine cytoplasmique et inhibe l'activité de l'ATPase.

Les études chez la souris ont montré que, dans le système circulatoire, le PLB est exprimé de différentes façons : une expression forte dans le muscle ventriculaire, une expression moyenne dans l'oreillette, et une expression faible, mais significative, dans le muscle lisse de l'aorte. Les niveaux d'expression différentielle du PLB dans les compartiments ventriculaires et auriculaires semblent être corrélés avec les différents paramètres de la contraction de ces muscles (Koss et al., 1995).

Le rôle du PLB dans la régulation de la contractilité du myocarde à l'état de base a été élucidé par le développement d'un modèle murin déficient en PLB (Luo et al., 1994). Ces souris ont une augmentation de la fonction cardiaque, y compris la fonction systolique, du taux de relaxation ventriculaire, et une amélioration du remplissage ventriculaire (Wolska et al., 1996). Ces résultats sont corrélés avec des analyses *in vitro* des cardiomyocytes ventriculaires isolés d'un cœur de la souris KO-PLB, qui a également montré une amélioration des taux de raccourcissement ainsi que de la cinétique du Ca^{2+}. Les paramètres de la contractilité cellulaire reflètent des modifications au niveau du réticulum sarcoplasmique : l'affinité de la pompe SERCA2a vis-à-vis du Ca^{2+} a été significativement augmentée, ce qui est associé à une augmentation du Ca^{2+} intraluminal

du réticulum sarcoplasmique dans le cœur de souris KO-PLB par rapport aux souris sauvages.

Le niveau d'ARNm de PLB est généralement réduit dans un cœur insuffisant chez l'Homme (Arai et al., 1993; Flesch et al., 1996), mais les changements au niveau des protéines immuno-réactives de la PLB ne sont pas systématiques (Linck et al., 1996; Movsesian et al., 1994). Les données concernant le niveau de phosphorylation du PLB cardiaque chez l'homme restent encore contradictoires (Schmidt et al., 1999).

Calcium induced calcium release (CICR ; figure 9) : l'entrée de Ca^{2+} au cours du PA déclenche l'ouverture des RyR et la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. L'ouverture d'un seul canal calcique de type L est suffisante pour déclencher une libération de Ca^{2+} par un cluster de RyR (étincelle calcique, ou *calcium spark*), mise en évidence par microscopie confocale et représentant un événement élémentaire de libération de Ca^{2+} (Cheng et al., 1993; Collier et al., 1999). La sommation de milliers de *sparks* associées à I_{CaL} permet une augmentation massive et transitoire du Ca^{2+} cytosolique nécessaire au développement de la contraction. Le RyR s'active pour des concentrations de Ca^{2+} < 100 nM, et atteint un maximum à plus de 100 µM. La probabilité d'ouverture (Po) du canal devient très faible pour des concentrations de l'ordre de la mM, le canal s'inactive (Fill et al., 2002).

La diminution rapide de la $[Ca^{2+}]_i$ permet la relaxation du myocyte. Selon l'espèce, 80% à 90% du Ca^{2+} cytosolique est recapté dans le RS par SERCA2a. Les 10% à 20% restant sont extrudés de la cellule, majoritairement par le NCX. Ainsi, SERCA2a contrôle la relaxation, le niveau de charge du RS et la $[Ca^{2+}]_i$. La fermeture du canal calcique induit une diminution localisée de Ca^{2+} qui, en cascade, est à l'origine de la fermeture des RyR et, enfin, la déplétion du Ca^{2+} du RS diminue la Po, induisant la fermeture synchronisée des RyR (Stern et al., 2004).

1.4 Le remodelage cardiaque

1.4.1 De l'hypertrophie cardiaque à l'insuffisance cardiaque

L'hypertrophie ventriculaire est une réponse du cœur pour compenser une augmentation du stress biomécanique (figure 10). Elle vise à normaliser le stress hémodynamique induit par des conditions de surcharge rencontrées, par exemple, au

cours de l'hypertension, de l'obésité, du diabète ou encore après la perte d'une partie du muscle cardiaque suite à un infarctus. Ce processus d'adaptation structurel est accompagné, au niveau électrique, par une augmentation du temps de repolarisation. Deux formes d'hypertrophie cardiaque, compensée ou décompensée, ont été associées avec une augmentation de l'incidence d'arythmies ventriculaires et de mort subite cardiaque (indépendante de l'origine de l'hypertrophie). Le processus hypertrophique n'est pas entièrement bénéfique (Vakili et al, 2001 ; Hill, 2003).

Le terme « remodelage » désigne une dynamique biologique qui se développe au sein d'un organe ou d'un tissu et qui, le plus souvent à travers des mécanismes à visée adaptative, conduit finalement à une dégradation de sa fonction.

Le terme « hypertrophie » est défini comme « un agrandissement ou une surcroissance d'un organe, ou d'une partie, dû à une augmentation de la taille de ses cellules constitutives » (Dorn et al, 2003). Sur le plan anatomique, l'hypertrophie cardiaque est définie par une augmentation de la masse totale du cœur, relative à la surface corporelle. Au niveau histologique, elle est caractérisée par une augmentation de la taille des myocytes, sans prolifération (sans hyperplasie). Cependant, certaines autres cellules présentes dans le myocarde, en particulier les cellules endothéliales des vaisseaux coronariens et les fibroblastes des espaces interstitiels, augmentent en taille et prolifèrent, avec pour conséquence une production excessive de matrice extracellulaire et de collagène, entraînant des lésions irréversibles de fibrose myocardique (Adamson et al, 2005).

L'hypertrophie peut évoluer vers la défaillance cardiaque (insuffisance cardiaque), caractérisée par la perte de l'aptitude du cœur à assurer sa fonction de pompe circulatoire. L'insuffisance cardiaque (IC), qu'elle soit secondaire à une hypertrophie ventriculaire, à une dilatation ou à un infarctus, est associée à un remodelage électrique complexe (Deroubaix et al., 1999; Aiba et al., 2010) qui conduit généralement à une prolongation de la durée des PA ventriculaires. Cet allongement a deux conséquences majeures : l'apparition de troubles du rythme cardiaque, qui augmentent fortement le risque de mort subite (Shah et al., 2005; Tomaselli et al., 1999; Janse et al., 2004), et une augmentation de l'influx calcique dans les myocytes, qui participerait à la pathogénèse de l'insuffisance cardiaque (Pinto et al., 1999).

Dans sa phase initiale, l'hypertrophie cardiaque représente un mécanisme d'adaptation nécessaire, permettant au cœur de maintenir ou d'augmenter le débit cardiaque (phase de compensation) en réponse à une augmentation de la pré- ou de la post-charge (Cohn, 1995). Cette réponse hypertrophique a pour but de normaliser la tension pariétale systolique du ventricule gauche (« wall stress »), qui augmente au cours des cardiopathies hypertensives, valvulaires ou après infarctus du myocarde. La réduction de la tension pariétale permet de réduire la consommation en oxygène du myocarde. Cependant, la fonction globale du myocarde hypertrophié n'est pas normale ; en particulier, la fonction diastolique semble altérée de façon précoce. A long terme, l'épaisseur pariétale ne peut plus croître suffisamment pour assurer un travail cardiaque suffisant. L'augmentation du flux coronarien, nécessaire à la perfusion du cœur hypertrophié, n'est plus suffisante pour assurer l'accroissement de la demande en oxygène. Pour maintenir le débit cardiaque et une pression de perfusion suffisante, le cœur se dilate (figure 10). Après un certain temps, les capacités d'adaptation sont dépassées, la fraction d'éjection du ventricule gauche diminue et l'insuffisance ventriculaire gauche apparaît (phase de décompensation). Les facteurs hémodynamiques ne sont pas les seuls mis en cause dans la physiopathologie de l'hypertrophie cardiaque. D'autres facteurs comme l'âge, le sexe, la taille, le poids, l'activité physique, l'hérédité et des facteurs neuro-endocriniens (noradrénaline, adrénaline, angiotensine, endothélines…) interviennent dans la genèse de l'hypertrophie cardiaque.

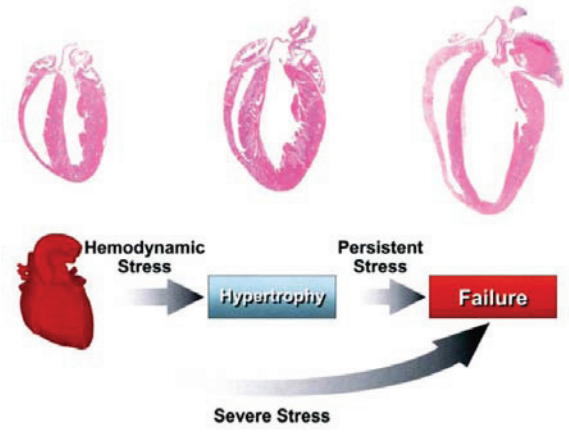

Figure 10 : *Histoire naturelle hypothétique d'une cardiopathie induite par un stress hémodynamique illustrée avec la section des quatre chambres d'un cœur de souris dans un modèle de surcharge de pression (Hill JA, 2003).*

Au niveau cellulaire, il existe une réinduction du programme génétique fœtal dans les cardiomyocytes hypertrophiés (Nuss et al., 1993, Martinez et al., 1999, Huang et al., 2000, Izumi et al. 2003). Parmi les gènes dont l'expression est altérée, on retrouve ceux qui codent l'expression des canaux ioniques du sarcolemme et des transporteurs électrogéniques. Ces changements d'expression peuvent contribuer à la croissance du muscle cardiaque et finalement à la dysfonction du myocarde (phase systolique et diastolique) en contribuant à l'altération de l'homéostasie calcique. Les mécanismes fondamentaux incluent (a) un défaut de régulation du RS et des récepteurs à la ryanodine (RyR2), couplé à (b) une séquestration anormale du Ca^{2+} secondaire à la diminution de l'expression de SERCA2a, associée à l'altération de l'expression et de la phosphorylation du PLB (Bers, 2002 ; Nattel et al., 2007).

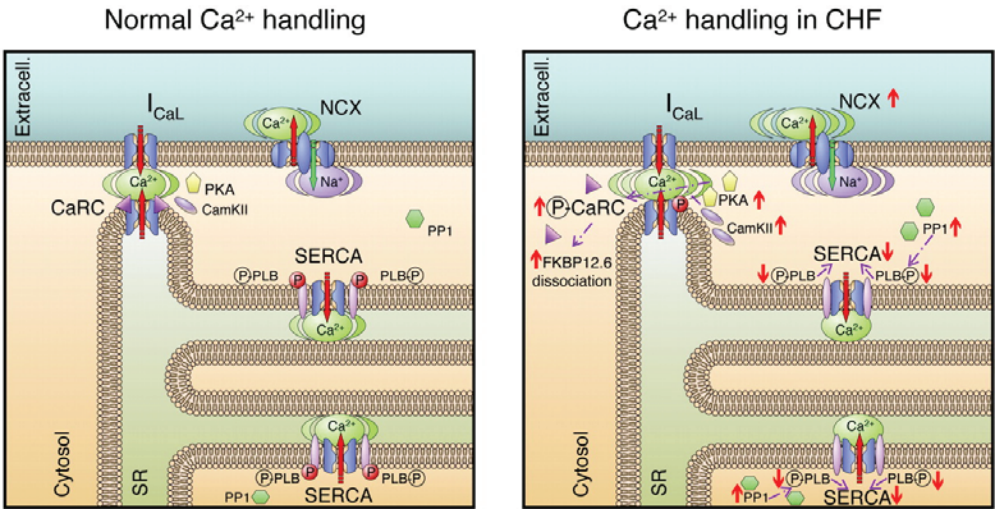

Figure 11 : *Illustration des mécanismes impliqués dans l'altération du transport de Ca^{2+} au cours du remodelage des myocytes ventriculaires dans un contexte d'insuffisance cardiaque. (Nattel et al., 2007).*

La densité de I_{CaL} est inversement corrélée avec la sévérité de l'hypertrophie ou de la dysfonction ventriculaire : dans les modèles d'hypertrophie légère ou modérée, I_{CaL} est souvent augmenté, tandis que dans l'hypertrophie sévère et l'IC, I_{CaL} est inchangé ou parfois diminué (Armoundas et al, 2001).

1.4.2 Remodelage électrophysiologique

1.4.2.1 Courant If

I_f se retrouve dans différents types cellulaires mais ses caractéristiques sont variables ; par exemple, ce courant est présent dans les cardiomyocytes ventriculaires (Yu et al., 1993, 1995), mais son potentiel d'activation est trop négatif pour qu'il puisse fonctionner dans le ventricule (Ranjan et al., 1998). Ce courant est diminué dans le nœud SA au cours de l'IC, et cette diminution peut causer la dysfonction sinusale chez un modèle de chien atteint d'IC (Zicha et al., 2005). A l'opposé, le courant I_f est augmenté dans les cardiomyocytes ventriculaires d'un modèle de rat atteint d'une hypertrophie cardiaque sévère (Cerbai et al., 1996; Sartiani et al. 2006). Au contraire, bien que le courant I_f soit trouvé avec une densité plus forte dans les myocytes ventriculaires d'un cœur humain insuffisant, la différence par rapport aux contrôles n'est pas statistiquement significative. De plus, il n'y a pas de différence dans la voltage-dépendance, les cinétiques ou les déplacements de la courbe d'activation sous l'effet de l'isoprénaline des cellules d'un cœur insuffisant par rapport aux cœurs contrôles (Hoppe et al., 1998). Néanmoins, l'augmentation de I_f lors de la réduction de la densité d'I_{K1} peut prédisposer les myocytes ventriculaires isolées d'un cœur insuffisant à une automaticité accrue. Le clonage du gène des canaux sous-tendant I_f laisse présager de nouvelles données dans ce domaine (Ludwig et al., 1999). Sa sensibilité à la stimulation β-adrénergique (activation) et à l'AMPc pourrait jouer un rôle important.

1.4.2.2 Courants dépolarisants

Le courant sodique (I_{Na}) rapide est responsable de la phase 0 de dépolarisation du PA (figure 12). L'analyse électrophysiologique n'a révélé aucune modification significative de I_{Na}, ni dans les modèles humain ou canin de défaillance cardiaque (Janse, 2004). Néanmoins, un courant I_{Na} à inactivation lente ($I_{Na,late}$) a été observée dans

plusieurs modèles animaux et humains de défaillance cardiaque (Carmeliet, 2006). Ce courant persistant provoquerait une surcharge de Na^+ intracellulaire et sa contribution au maintien de dépolarisation pendant le plateau du PA serait très arythmogénique.

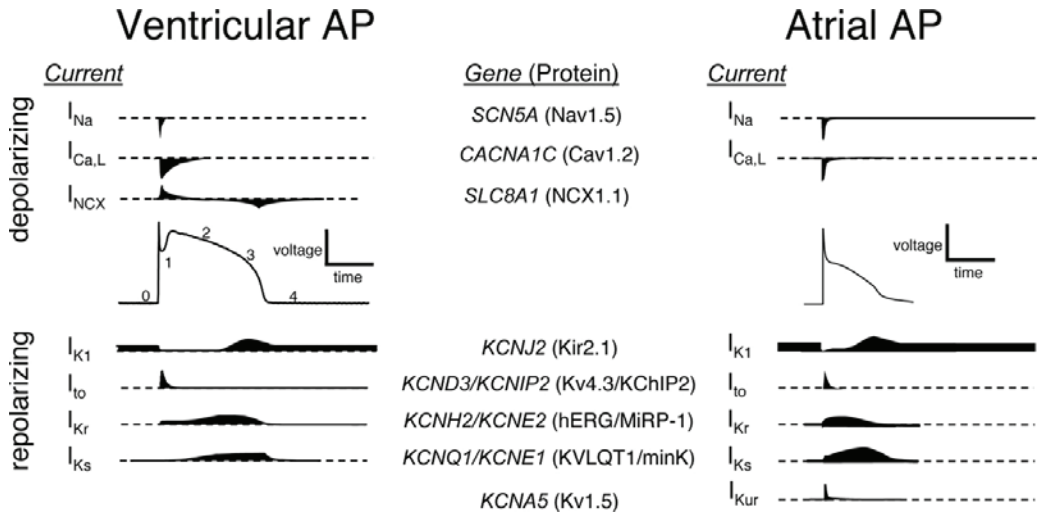

Figure 12 : *Les principaux courants ioniques dépolarisants et repolarisants qui sous-tendent le potentiel d'action ventriculaire (à gauche) et auriculaire (à droite) dans le cœur humain sont représentés. Les chiffres 0, 1, 2, 3, 4 correspondent aux différentes phases du PA. Un schéma de l'évolution en fonction du temps de chaque courant est affiché, et les gènes (sous-unités régulatrices et canaux) qui sous-tend chaque courant sont indiqués (Shah et al., 2005).*

Bien que l'altération de l'homéostasie calcique soit caractéristique de l'insuffisance cardiaque dans les modèles animaux ainsi que chez l'Homme (Morgan et al., 1990), les mécanismes de base impliqués dans le remodelage du couplage excitation-contraction restent controversés. Différentes formes de remodelage sont associées à des modèles distincts de l'expression des gènes, et donc avec des phénotypes moléculaires différents (Calderone et al., 1995). Les modèles animaux d'hypertrophie (Bryant et al., 1997) et d'insuffisance cardiaque (Akar et al., 2001) suggèrent une hétérogénéité régionale importante dans la durée du PA. La dispersion spatiale et temporelle accrue du PA monophasique, de la période réfractaire, et de l'intervalle QTc de l'ECG chez les humains (Barr et al., 1994; Berger et al., 1997), ainsi que chez les animaux souffrant

d'insuffisance cardiaque (Pak et al., 1997) sont compatibles avec une dispersion importante de la durée du PA qui peut prédisposer aux arythmies ventriculaires.

La densité du courant I_{CaL} a été étudiée dans un certain nombre de modèles animaux d'hypertrophie ventriculaires et d'IC (Hart, 1994). La sévérité de l'hypertrophie ou de l'insuffisance semble être inversement corrélée à la densité du courant de type L (Cerbai et al., 1994; Ryder et al., 1993; Furukawa et al., 1994) ou au nombre de sites de liaison aux dihydropyridine (DHP), (Creazzo, 1990; Vatner et al., 1994). Le courant calcique de type L est généralement augmenté dans l'hypertrophie cardiaque (légère à modérée), mais est inchangé ou diminué dans l'hypertrophie sévère et l'IC.

Dans la plupart des études sur I_{CaL} dans les cellules isolées à partir d'un cœur insuffisant, il n'y a aucun changement dans les cinétiques ou le voltage dépendance. Toutefois, un ralentissement de la décroissance du courant (configuration cellule entière) a été observé dans certains modèles, un changement qui pourrait altérer le couplage excitation-contraction et qui tend à prolonger la durée du PA (Ahmmed et al., 2000; Keung, 1989). Il convient de noter que la plupart des mesures de I_{CaL} ont été réalisées dans des conditions non physiologiques ; notamment l'utilisation conventionnelle des tampons intracellulaires à haute affinité pour le calcium, comme l'EGTA, permettant de réprimer l'inactivation des canaux de type L médiée par le calcium, ce qui peut potentiellement conduire à une sous-estimation des différences de cinétique entre un myocyte normal et insuffisant (Winslow et al., 1989).

Le niveau d'expression des récepteurs à la ryanodine RyR n'est pas modifié au cours de l'hypertrophie et de l'IC. Il a été cependant suggéré que la quantité de RyR fonctionnels pouvait chuter (Ueyama et al., 1998). Dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche chez le lapin, Milnes et al. ont montré que le nombre de RyR correspondant à un DHPR était significativement réduit. Ce découplage fonctionnel a été décrit comme étant à l'origine d'une libération du Ca^{2+} défectueuse, sans modification du rapport entre les deux canaux, de la charge du RS et de la sensibilité aux Ca^{2+} des RyR (caractéristiques de spark conservées) (Gomez et al., 1997). De plus, il a été montré que le niveau d'expression de FKBP12.6 est significativement diminué au cours de l'IC, et que cette réduction induit une fuite anormale de Ca^{2+} du RS (Yano et al., 2000). FKBP12.6 apparait donc comme un acteur important dans la pathogenèse de l'IC. De

façon intéressant, en utilisant un modèle murin surexprimé spécifique (double transgénique avec le système de régulation Tet On/Off) de FKBP12.6, notre étude a montré qu'une augmentation de FKBP12.6 à la liaison avec RyR2 peut diminuer les tachycardies ventriculaires induites par la stimulation ventriculaire rapide ou par l'injection d'isoproterenol (0.2 mg/kg). La stabilisation du complexe RyR2-FKBP12.6 peut diminuer de la fuite calcique du RS dans la phase diastolique (sous condition de stress cardiaque) ce qui donne un effet anti-arythmique. Ce résultat suggère que le complexe RyR2-FKBP12.6 est une cible pharmaceutique dans le traitement des arythmies ventriculaires (Gellen et al., 2008).

Au cours de l'IC, la réduction du nombre de SERCA2a fonctionnelles est rapportée dans de nombreux modèles et serait un marqueur du passage de l'hypertrophie à l'IC. En conséquence, au cours de la pathologie, le recaptage et l'activité de la SERCA2a sont réduits (Bastie et al., 1990; Mercadier et al., 1990). Le rapport phospholamban/SERCA est, quant à lui, soit conservé avec un faible niveau de phosphorylation, soit augmenté (le niveau d'inhibition de la pompe est alors plus important). Il en résulte une diminution de la sensibilité au Ca^{2+} qui renforce le ralentissement du recaptage (Schwinger et al., 1999). Cette réduction de l'activité de la pompe, associée à une augmentation du courant médié par NCX et à la fuite accrue de Ca^{2+} du RS, contribue à l'inversion de la relation force-fréquence, à la diminution du Ca^{2+} systolique, à l'augmentation de Ca^{2+} diastolique et au ralentissement de la relaxation (Hasenfuss et al., 1999).

Comme cela est décrit précédemment, deux populations de canaux calciques activés par le potentiel, avec des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes, coexistent : ils génèrent des courants de type T (I_{CaT}) et des courants de type L (I_{CaL}). Dans le myocarde adulte, la contribution de I_{CaT} est très limitée, voire inexistante. Chez l'Homme, I_{CaT} n'a jamais été détecté sur les cellules isolées de ventricule adulte normal ou insuffisant (Benitah et al., 2002; Richard et al., 1998). Il pourrait cependant être exprimé au cours de stades précoces du développement post-natal comme chez le rat (Vassort et al., 2006). De nombreuses études font cependant mention d'une augmentation de I_{CaT} au cours de la pathologie. C'est le cas, par exemple, des myocytes ventriculaires hypertrophiés après ligature de l'aorte chez le chat, des cellules

ventriculaires de hamsters syriens présentant une cardiomyopathie, et des myocytes ventriculaires hypertrophiés après surcharge de pression chez le rat (Vassort et al., 2006). Pour l'instant, le rôle de I_{CaT} dans ces processus pathologiques demeure assez énigmatique.

I_{CaL} est majoritaire et ubiquitaire dans les cardiomyocytes. Le rôle et l'évolution de I_{CaL} au cours de l'hypertrophie et de la défaillance cardiaques commence à se clarifier malgré des divergences. Il semblerait notamment que la densité (amplitude du courant rapportée à la surface de la cellule) de I_{CaL} augmente dans un premier temps, se normalise durant l'hypertrophie compensée et, finalement, ne change pas ou diminue dans la défaillance cardiaque sévère, y compris chez l'homme (stade 4 de la NYHA) (Benitah et al., 2002; Richard et al., 1998-2006). Pourtant, les analyses réalisées au niveau du canal unique isolé suggèrent que les canaux de type L ont une disponibilité et une probabilité d'ouverture plus grande. Pour expliquer cette incohérence apparente, une possibilité serait que les myocytes ventriculaires de cœurs insuffisants expriment moins de canaux Ca^{2+}, mais que ceux-ci soient plus actifs. L'analyse des ARN messagers (*Northern blot*) ne révèle pas de différence d'expression des sous-unités α1c qui forme le pore du canal, ni des principales sous-unités régulatrices.

Deux éléments majeurs contrôlent l'entrée de Ca^{2+} *via* I_{CaL} :

- la densité des canaux fonctionnels, qui détermine l'amplitude du courant et donc la quantité de Ca^{2+} libéré par le RS;

- la cinétique d'inactivation de ce courant, qui met fin à l'entrée de Ca^{2+}.

Le Ca^{2+} libéré par le RS induit une inactivation rapide de I_{CaL} et participe ainsi au contrôle de la durée du PA. Ce rétrocontrôle négatif du Ca^{2+} sur sa propre entrée disparaît lors de la défaillance cardiaque. Une conséquence est la perte d'adaptation d'I_{CaL} et de la durée du PA à la fréquence cardiaque, mécanisme qui se traduit normalement par une augmentation d'I_{CaL}, avec un ralentissement marqué de son inactivation, à fréquence élevée, et par un allongement du PA (chez le rongeur). Ce mécanisme contribuerait à l'effet *Bowditch* (ou relation force fréquence positive). Sur les myocytes isolés de ventricules humains en défaillance cardiaque, cette adaptation d'I_{CaL} à la fréquence de stimulation disparaît, probablement du fait d'une moins bonne charge calcique du RS (Richard et al., 2006).

L'entrée du Ca^{2+} *via* I_{CaL} permet le *Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release* (CICR), à la base du CEC cardiaque. Dans la défaillance cardiaque, la variation transitoire du $[Ca^{2+}]_i$ et la contraction cellulaire qui lui sont associées sont diminuées. Puisque la densité de I_{CaL} est probablement maintenue, la réduction du transitoire $[Ca^{2+}]_i$ implique nécessairement une altération du CEC (Richard et al., 2006). Le défaut responsable de ce « découplage » reste à identifier. Une réduction de la charge calcique du RS a été montrée dans les myocytes de patients en défaillance cardiaque terminale et chez des chiens ayant développé une défaillance cardiaque par tachycardie imposée. Cependant, dans certains modèles animaux, même dans des conditions où la charge calcique du RS est maintenue, il y a toujours un défaut du CEC. Cela pourrait être dû à un éloignement physique ou fonctionnement entre le canal calcique de type L et le RyR (Benitah et al., 2002). Étant donné que le CICR a lieu dans la région du RS jonctionnel (où les canaux calciques de type L sont localisés), on comprend aisément qu'une désorganisation des tubules transverses peut induire une altération du CEC des myocytes en défaillance cardiaque. Par ailleurs, une libération anormale de Ca^{2+} (fuite calcique), liée à des ouvertures spontanées indésirables pendant la phase diastolique, est un phénomène bien établi dans la défaillance cardiaque. Elle contribuerait à provoquer des troubles du rythme ventriculaires; parfois fatals (Wehrens et al., 2003).

Le Ca^{2+} peut aussi entrer dans les myocytes (ou en sortir) *via* l'échangeur Na^{+}-Ca^{2+}, dont l'activité électrogénique module le décours du PA (figure 12). L'activité de l'échangeur dépend du gradient des concentrations de Na^{+} et Ca^{2+} et permet d'expulser le Ca^{2+} hors de la cellule après chaque contraction pour favoriser la relaxation cellulaire. Mais il peut fonctionner aussi en mode inverse en faisant entrer du Ca^{2+} dans la cellule et, ainsi, contribuer à la contraction. L'expression et l'activité de l'échangeur Na^{+}-Ca^{2} sont augmentées dans l'hypertrophie et la défaillance cardiaque, mais l'implication physiopathologique reste incertaine. Une augmentation de l'ARNm et de la protéine a été rapportée chez l'homme et chez l'animal (Pogwizd et al., 2004). En parallèle, une augmentation de son activité est aussi rapportée. L'échangeur favoriserait la relaxation en extrudant le Ca^{2+} intracellulaire, plus élevé que la normale dans la défaillance cardiaque, pour compenser la défaillance de repompage du Ca^{2+} dans RS, tout en soutenant la contraction selon un équilibre complexe. Le I_{NCX} généré par l'extrusion de Ca^{2+} constitue

la composante majeure d'un courant transitoire entrant (I_{Ti}) arythmogénique, responsable de post-dépolarisations retardées, source d'arythmies ventriculaires déclenchées létales (Janse, 2004; Pogwizd et al., 2004). L'augmentation de I_{NCX} a donc potentiellement un effet proarythmogénique (Pogwizd et al., 2004).

1.4.2.3 Courants repolarisants

Le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to1}) joue un rôle primordial dans la phase 1 de la repolarisation du PA cardiaque. Il contrôle la phase de plateau et l'entrée de Ca^{2+}. Les expériences de voltage imposé sur des cardiomyocytes de cœur hypertrophiés relèvent des réductions marquées de sa densité (Janse et al., 2004; Shah et al., 2005). Cependant, dans les modèles d'hypertrophie compensée (surcharge de pression), la densité de ce courant reste inchangée (Brooksby et al., 1993) ou est même augmentée (Ten Eick et al., 1993; Li et al., 1994). Chez l'Homme, la densité de I_{to1} est également diminuée dans la défaillance cardiaque, ce qui explique bien l'allongement de la durée des PA (Bailly et al., 1997). Deux gènes de la sous-famille des canaux Kv4, Kv4.2 et Kv4.3, codent pour les canaux cardiaques qui sous-tendent I_{to1} (Nerbonne, 2001). Le taux d'ARNm de Kv4.3 est diminué dans le ventricule gauche de cœurs humains en défaillance cardiaque (Kaab et al., 1998).

I_{to1} est distribué de façon hétérogène dans le muscle ventriculaire (Benitah et al., 1993), ce qui joue un rôle majeur dans les différences régionales de la forme de PA (Antzelevitch, 2001). La différence de densité de I_{to1} entre le myocarde sous-épicardique et le myocarde sous-endocardique est également réduite dans les cœurs humains en défaillance cardiaque (Nabauer et al., 1996), avec une diminution importante de ce courant au niveau sous-épicardique. Les cardiomyocytes ventriculaires sous-épicardiques à la zone frontière à 5 jours après infarctus du myocarde possèdent très peu de courant I_{to1} voire aucun (Lue et al., 1992). Or, une réduction non uniforme de I_{to1} est susceptible de créer des conditions favorisant la survenue d'arythmies.

Au cours de l'hypertrophie ventriculaire, le courant I_{K1} (rectification entrante) est diminué (Brookspy et al., 1993), augmenté (Kleiman et al., 1989) ou inchangé (Ryder et al., 1993). Une réduction de I_{K1} pourrait induire une dépolarisation diastolique

approchant le seuil de déclenchement automatique des PA. Il semble aujourd'hui de plus en plus admis que I_{K1} est diminué dans la défaillance cardiaque (Kleiman et al., 1989).

Les courants potassiques à rectification retardée (I_{Kr}, I_{Ks}) sont diminués au cours de l'IC, ce qui peut conduire à un allongement du PA, fournissant ainsi un substrat pour l'initiation de post-dépolarisations précoces, comme largement décrit dans certains types de syndrome du QT long (Shah et al., 2005). Les niveaux d'ARNm de Herg, KvLQT1 et minK sont diminués chez le modèle de chien post-infarctus du myocarde (Jiang et al., 2000). Le modèle de bloc AV complet chez le chien montre une augmentation importante de la durée du PA, ainsi qu'une dispersion de la durée des PA qui conduit à l'apparition de torsade de pointes en présence d'une stimulation cardiaque ou d'anti-arythmiques de classe III (Vos et al., 1998). La fonction du canal $I_{K,ATP}$ ne change pas au cours du remodelage cardiaque mais il y a une réduction de la sensibilité à l'inhibition par l'ATP intracellulaire (Koumi et al., 1997).

1.4.2.4 Jonctions gap

La propagation de l'activité électrique dans le myocarde nécessite l'intégrité d'un type particulier de jonction intercellulaire : les jonctions "*gap*" ou jonctions communicantes (Bernstein et al., 2006). Les jonctions *gap* sont des structures spécialisées de la membrane qui contiennent plusieurs canaux ioniques intercellulaires qui facilitent la communication électrique et chimique entre les cellules. Ces structures sont des agrégats de canaux intercellulaires formés par des protéines transmembranaires appartenant à la famille des connexines (Cx) (Goodenough et al., 1996). De récentes expériences de délétion des gènes des connexines, réalisées chez la souris, et l'analyse de maladies cardiaques congénitales humaines, permettent d'évaluer le rôle joué par ces protéines et les canaux qu'elles constituent dans la propagation de l'influx électrique dans le myocarde (Dobrowolski et al., 2009).

Tous les myocytes sont connectés les uns aux autres par des jonctions communicantes qui sont généralement localisées dans les disques intercalaires. Le nombre de canaux dans ces jonctions varie de quelques unités à plusieurs milliers. Il dépend de l'espèce, du stade de développement du myocarde et du tissu cardiaque considérés. Les jonctions communicantes des myocytes ventriculaires sont,

statistiquement, plus grandes que celles des myocytes auriculaires. La distribution et la taille des jonctions communicantes entre les myocytes sont des facteurs qui entrent en jeu dans la propagation de l'activité électrique, et qui sont sujets à un remodelage dans certaines pathologies cardiaques (Servers, 1990).

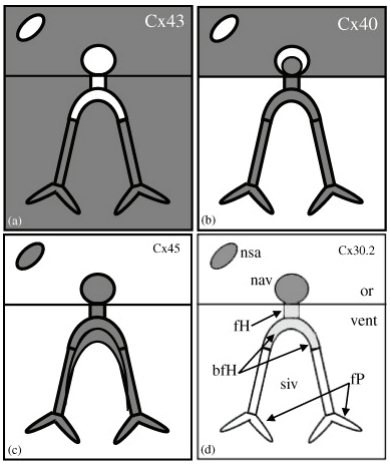

Figure 13 *: Profils d'expression des Cx dans le cœur de souris adulte. Seules les expressions dans les cardiomyocytes sont représentées. Or : oreillettes ; vent : ventricule ; nsa : nœud sinoauriculaire ; nav : nœud auriculoventriculaire ; fH : faisceau de His ; bfH : branches du faisceau de His ; fP : fibres de Purkinje ; siv : septum interventriculaire. (van Veen et al., 2001).*

Les souris invalidées (*knockout*) pour le gène de la **connexine 43** (Cx43-/-) meurent par asphyxie peu de temps après la naissance (Kumai et al., 2000). Ces souris présentent une obstruction du tronc pulmonaire empêchant le sang d'atteindre les poumons et des défauts des artères coronaires. La Cx43 joue donc un rôle important dans la morphogenèse cardiaque. L'analyse des souris Cx43+/-, qui sont viables, a montré que la propagation de l'influx dans les oreillettes était normale, et qu'en conséquence la Cx43 n'intervenait que peu, ou pas, dans les phénomènes de conduction auriculaire, et ce probablement parce que la Cx40 joue dans ce compartiment un rôle déterminant. Sur un modèle de souris KO conditionnel de Cx43 cardiaque, Gutstein et al. (2001) ont montré que la performance cardiaque n'est pas affectée et que la structure cardiaque est normale bien que l'expression de la Cx43 y soit réduite de 90%. Toutefois, la vitesse de conduction ventriculaire est ralentie d'environ 50%. Toutes ces souris meurent

subitement à l'âge de deux mois suite à des fibrillations ventriculaires spontanées. Le mécanisme électrophysiologique conduisant aux arythmies létales dans ce modèle correspond à un ralentissement de la propagation de l'influx électrique, sans changement de la période réfractaire ventriculaire effective. Ces résultats démontrent bien l'importance des Cx43 dans la physiologie du tissu ventriculaire (Gutstein et al., 2001; Danik et al., 2004).

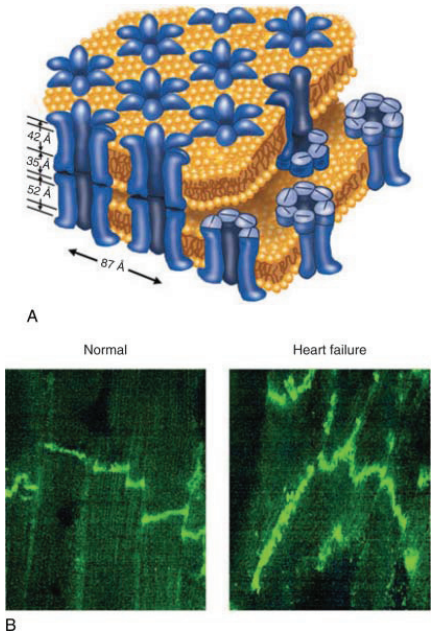

Figure 14 *: **A**, Modèle de la structure d'une jonction gap fondée sur les résultats de diffraction aux rayons X. Les canaux individuels sont composés de paires d'hexamères qui passent dans les membranes des cellules adjacentes et contiguës dans le gap extracellulaire pour former un pore aqueux qui assure la continuité du cytoplasme des deux cellules. **B**, Coupes d'un cœur de chien normal (à gauche) et d'un cœur de chien atteint d'une cardiomyopathie dilatée (à droite) avec un immunomarquage de la connexine 43. Il y a une latéralisation des connexines 43 dans le cœur insuffisant (Davis et al., 1995; Akar et al., 2004).*

La connexine 40 (Cx40) est impliquée dans la conduction auriculaire et atrio-ventriculaire. Le myocarde des souris adultes Cx40-/- a fait l'objet de nombreuses études électrophysiologiques qui ont montré qu'une absence de Cx40 entrainait des perturbations de la conduction sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire (Kirchhoft et al., 1998), un ralentissement d'environ 30% de la conduction dans les oreillettes, un retard de

propagation de l'influx dans le faisceau de His, parfois des blocs de branches du premier degré (Simon et al., 1998), et enfin, une forte tendance au déclenchement de la fibrillation auriculaire provoquée (Verheule et al., 1999). Ces résultats mettent en évidence l'implication de la Cx40 dans les phénomènes de conduction auriculaire et atrio-ventriculaire, et sont en accord avec son profil d'expression.

La délétion germinale du gène de la **Connexine 45** (Cx45) est létale. Tous les embryons des souris Cx45-/- meurent entre les stades E9,5 et E10,5 (Kruger et al., 2000). Divers défauts qui contribueraient à la mort des embryons ont été observés : une interruption générale du développement des vaisseaux, une altération de la fonction placentaire, une apoptose massive et des anomalies du myocarde (dilatation des chambres, absence des bourrelets endocardiques, trabéculation réduite). De façon intéressante, dans les 24 h des premières contractions du cœur en développement dans l'utérus, il y a une déficience grave de la contraction auriculaire et un bloc de conduction auriculo-ventriculaire apparaît (Kumai et al., 2000).

La **Connexine 30.2** (Cx30.2), exprimée dans les cardiomyocytes du nœud AV, contribue ainsi au ralentissement de la propagation de l'activité électrique dans ce tissu. Elle est donc impliquée dans la coordination des contractions auriculo-ventriculaires et protège les ventricules des arythmies auriculaires (Schrickel et al., 2009).

Des changements importants de densité et de distribution des connexines cardiaques ont été démontrés dans l'ischémie (Smith et al., 1991), l'hypertrophie (Peters et al., 1993), la cardiomyopathie dilatée (Dupont et al., 2001) ainsi que lors d'un rejet cardiaque aigu (Lerner et al., 2001) chez l'homme. L'expression de la Cx43 est diminuée et il existe des changements majeurs dans sa localisation spatiale (figure 14B), par rapport à l'expression plus restreinte aux disques intercalaires dans des conditions normales (Jongsma et al., 2000). Le contenu total de Cx43 est réprimé dans l'IC et il y a une réduction du niveau d'expression de son ARNm dans les deux étiologies ischémiques et non ischémiques (Dupont et al., 2001). Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le chien, la distribution anormale de la Cx43 coïncide avec la conception des circuits de rentrée en forme de huit (Peters et al., 1997). L'ischémie myocardique aiguë est associée à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et $[H^+]_i$ qui permettent de réduire l'activité des canaux des jonctions *gap*. Les altérations de la signalisation β-adrénergique et du système rénine-

angiotensine-aldostérone dans le cœur insuffisant sont associées à une réduction de la conductance jonctionnelle (De Mello 1998; 1996). Toutefois, des expériences *in vitro* sur des myocytes ventriculaires de rat nouveau-né ont révélé une augmentation significative d'expression de la Cx43 lors de l'exposition à l'angiotensine II, un effet bloqué par le losartan (Dodge et al., 1998). Les conséquences fonctionnelles d'une telle réduction de l'expression de la Cx43, associée à un remodelage local des jonctions, sont certes difficiles à évaluer, mais l'analyse des souris déficientes en Cx43 dans les myocytes suggère qu'une diminution importante du niveau d'expression de la Cx43 dans le tissu ventriculaire est un facteur pro-arythmique déterminant (Gutstein et al., 2001; Kontogeorgis et al., 2008).

Les patients atteints d'IC présentent une variété de troubles du rythme cardiaque, qui comprennent les tachyarythmies auriculaires (fibrillation auriculaire en particulier) et ventriculaires. Les deux mécanismes contribuent à la morbidité et la mortalité dans l'IC (Nattel et al., 2007; Ehrlich et al., 2002).

1.5 Mécanismes des arythmies cardiaques :

Les mécanismes à l'origine des arythmies sont habituellement groupés en trois catégories : formation anormale ou augmentée de l'influx (automatisme), activité déclenchée et réentrée. L'automatisme peut se subdiviser en normal et anormal, et l'activité déclenchée peut résulter de post-dépolarisations précoces ou tardives.

1.5.1 L'automatisme

C'est la propriété normale de certaines cellules cardiaques d'autogénérer un PA. Cette activité résulte de la dépolarisation diastolique spontanée, causée par un courant ionique net d'entrée durant la phase 4 du PA qui amène le potentiel de membrane jusqu'au seuil de dépolarisation d'un nouveau PA. Dans les conditions normales, le nœud SA exerce cette propriété avec la fréquence intrinsèque la plus rapide, de sorte que l'activité des foyers accessoires situés en aval dans le nœud AV et le tissu de His-Purkinje reste latente.

L'automatisme anormal, ou automatisme induit par la dépolarisation, s'observe dans des conditions qui réduisent le PR, telles que l'ischémie et plus généralement toutes

les altérations pathologiques de la cellule myocardique. Dans les conditions expérimentales, l'automatisme anormal s'obtient aussi bien dans les tissus cardiaques comportant une dépolarisation diastolique spontanée que dans ceux qui en sont dépourvus, comme le myocarde commun auriculaire et ventriculaire. La fréquence propre de l'automatisme anormal est nettement plus élevée que celle de l'automatisme normal, et elle est d'autant plus rapide que le PR est moins négatif. De même que l'automatisme normal, l'automatisme anormal est stimulé par les agonistes β-adrénergiques, l'endothéline 1, l'histamine et par la diminution du potassium extracellulaire (Katz et al., 1956).

Les études expérimentales récentes suggèrent un rôle de l'automaticité dans les troubles du rythme cardiaque. Haissaguerre et ses collègues ont montré que la fibrillation auriculaire peut être déclenchée par l'automaticité accélérée rapide dans les veines pulmonaires (Haissaguerre et al., 1996). En outre, l'augmentation importante de la dépolarisation diastolique (Vermeulen et al., 1997 ; Nuss et al., 1999) et du courant de pacemaker I_f (Hope et al., 1998 ; Cerbai et al., 1996) dans les myocytes isolés à partir d'un cœur hypertrophié ou défaillant dans des modèles animaux ou humains suggère que ces mécanismes contribuent à l'apparition d'extrasystoles et de tachyarythmies dans ces pathologies. Il convient également de noter que les tissus auriculaires isolés des patients atteints de fibrillation auriculaire présentent une augmentation d'expression d'ARNm codant les canaux HCN, porteurs du courant I_f (Lai et al., 1999).

Le mécanisme d'arythmie d'un cœur hypertrophique est multifactoriel, mais son origine dépend, au moins en partie, des altérations du courant électrique qui résultent de l'allongement du PA ventriculaire (post-dépolarisations précoces et retardées : « early and delayed afterdepolarizations » EADs – DADs). Une post-dépolarisation est une oscillation du potentiel membranaire lors de la phase de repolarisation (EADs) ou après la repolarisation totale du PA (DADs) (Cranefield, 1977 – figure 15).

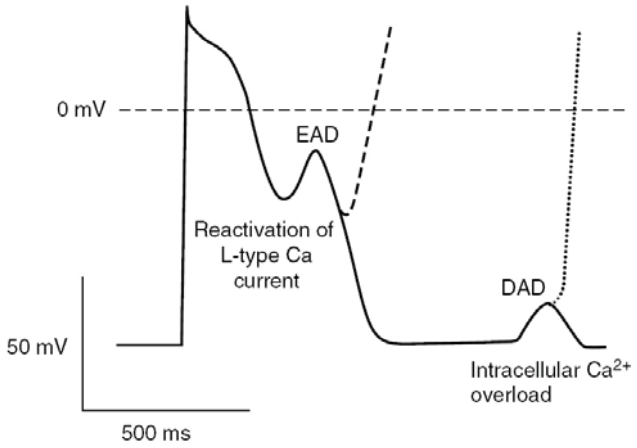

Figure 15 **:** *Post-dépolarisation précoces (EADs) et retardées (DADs) (Cranefield, 1977).*

1.5.2 Les post-dépolarisations précoces

Une condition fondamentale au développement des EADs est un allongement de la durée du PA, qui se traduit par une prolongation de l'intervalle QT sur l'ECG de surface (Antzelevitch et al., 1994). Les EADs surviennent soit pendant la phase 2 (à des valeurs de potentiel supérieures à -30 mV), soit au cours de la phase 3 du PA (à des valeurs plus négatives) (figure 15, 16). Les EADs sont observées dans différents types d'altérations des tissus cardiaques (Lab, 1982) : altérations électrolytiques, hypoxie, acidose (Adamantidis et al., 1986), exposition à de fortes concentrations de catécholamines (Volders et al., 1997) ou à des agents pharmacologiques (Brachmann et al., 1983), y compris les médicaments anti-arythmiques (January et al., 1988 ; Carmeliet, 1985). Ainsi, les antiarythmiques de classe III provoquent une activité déclenchée à des fréquences de stimulation basse, cette activité cessant à des fréquences de stimulation élevées (Roden et al., 1986).

L'hypertrophie ventriculaire et l'IC sous toutes leurs formes prédisposent également au développement des EADs (Volders et al., 1998 ; Nuss et al., 1999).

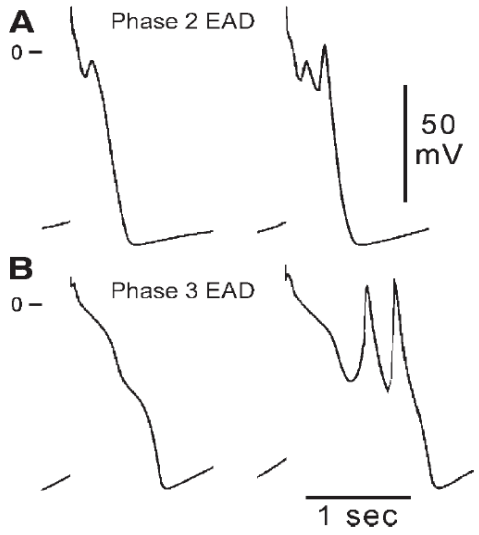

Figure 16*. Les post-dépolarisations précoces et l'activité déclenchée. Les tracées à gauche représentent des post-dépolarisations précoces ; les tracées à droite montrent des activités déclenchées. (A) Les post-dépolarisations précoces et les activités déclenchées se présentent au niveau du plateau du PA (phase 2). (B) Les post-dépolarisations précoces et les activités déclenchées se présentent au niveau de la phase 3 du PA (Davidenko et al., 1989).*

Les EADs apparaissent facilement dans les cellules midmyocardiques (M) et les fibres de His-Purkinje (dont la durée du PA augmente considérablement lorsque la fréquence cardiaque diminue). Ces tissus présentent un courant I_{Ks} faible ce qui les prédispose à un allongement de la repolarisation lorsque I_{Kr} est bloqué. D'une manière générale, les EADs sont associées à un allongement des courants entrants et à une diminution des courants sortants. L'inhibition de I_{Ks} par le chromanol 293B n'induit pas d'EADs dans les cellules ventriculaires (Burashnikov et al., 2000). Cependant, la combinaison des inhibiteurs de I_{Kr} et des inhibiteurs de I_{Ks} (chromanol 293B + E4031 ou sotalol) peut induire des EADs dans les tissus sous-épicardique et sous-endocardique, comme en présence d'une diminution des courants I_{Kr} et I_{Ks} dans les différentes formes de cardiomyopathie (Burashnikov et al., 2002). Il existe des différences considérables dans les mécanismes ioniques à l'origine des EADs dans les fibres de Purkinje et dans les cellules M, notamment en ce qui concerne le rôle du calcium du réticulum sarcoplasmique. La ryanodine, un agent connu pour bloquer la libération de calcium par le RS, supprime l'activité déclenchée par des EADs dans les cellules M canines mais non dans les fibres de Purkinje (Liu et al., 1995). Ces distinctions peuvent refléter des

différences dans la régulation du calcium intracellulaire dans les cellules M, où le RS est bien développé, par rapport aux fibres de Purkinje où le RS est peu développé.

On pense que l'activité déclenchée liée aux EADs est impliquée dans le mécanisme des tachycardies ventriculaires polymorphes de type torsade de pointes du syndrome du QT long, héréditaire ou acquis. Des déflections compatibles avec des EADs ont été enregistrées sur les PA monophasiques ventriculaires immédiatement avant l'apparition de torsades de pointes cliniques ou expérimentales (Murakawa et al., 1997). Les EADs pourraient aussi participer à la genèse des arythmies cardiaques lors de l'hypertrophie myocardique et de l'IC, situations dans lesquelles les PA tendent à s'allonger, condition propice au développement des EADs.

Contrairement aux DADs, les EADs dans la phase 2 du PA sont indépendantes de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Marban et al., 1986, Zeng et al., 1995). L'allongement du PA et la réactivation des courants dépolarisés sont les principes fondamentaux pour les produire. Le plateau du PA est une phase de haute résistance membranaire durant laquelle il y a un faible courant. Lors de la phase 2, I_{Na} est inactivé et les EADs peuvent résulter de la réactivation de I_{CaL}. Cependant, certains groupes ont présenté des preuves solides à l'appui de l'influence du taux de calcium intracellulaire dans la formation d'au moins la phase initiale de l'EAD (Burashnikov et al., 1998; Patterson et al., 1997). Cet écart est en partie dû au type de tissus ou de cellules étudiées. Les arythmies déclenchées par les EADs sont dépendantes de la fréquence.

<u>En résumé, les mécanismes ioniques responsables des EADs sont</u> :

1. La diminution des courants potassiques repolarisants (I_{Kr}, agents antiarythmiques de classe IA et III ; I_{Ks}, chromanol 293B).
2. L'augmentation des courants calciques disponibles (I_{Ca}).
3. L'augmentation des courants NCX à cause de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ ou l'augmentation de l'échangeur (Bay K 8644, catécholamines).
4. L'augmentation du courant I_{Na} retardé (aconitine, anthopleurin-A, et ATX-II).

Les combinaisons de ces interventions (surcharge de calcium et réduction de I_{Kr}, par exemple) peuvent avoir un effet synergique pour faciliter le développement des EADs (Burashnikov et al., 1998 ; Nattel et al., 1988 ; Szabo et al., 1995 ; Patterson et al., 1997).

1.5.3 Les post-dépolarisations retardées

Les DADs sont des oscillations du potentiel transmembranaire qui apparaissent après la fin du processus de repolarisation (figure 15), et qui dépendent donc de l'activité précédente pour se manifester : il s'agit d'une activité « déclenchée ». Une caractéristique cellulaire indispensable à l'induction de DAD est la présence d'une augmentation de la charge de Ca^{2+} dans le cytosol et le RS (Marban et al, 1986). L'inhibition de la Na^+K^+-ATPase par les glycosides digitaliques augmente le Na^+ intracellulaire, qui va être échangé avec le Ca^{2+} par l'échangeur Na-Ca (NCX, 3 Na^+ pour 1 Ca^{2+}), conduisant secondairement à une augmentation de la charge intracellulaire en Ca^{2+}. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ active un courant entrant transitoire (I_{Ti}) qui dépolarise la cellule (Vermeulen, 1998). Les catécholamines et l'ischémie peuvent induire des DADs par l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Marchi et al., 1991). Contrairement aux EADs, les DADs sont toujours induites par des fréquences de stimulation rapides. Les agents pharmacologiques qui affectent la libération et le recaptage de Ca^{2+} par le RS (caféine, ryanodine) favorisent l'apparition de DADs.

Les DADs et les contractions qu'elles induisent correspondent à la libération oscillante de Ca^{2+} à partir du RS dans des conditions de surcharge de cet ion. Nombre de travaux suggèrent que ce mécanisme a un rôle arythmogène important, spécialement dans les rythmes bigéminés et dans les tachycardies ventriculaires (Song et al., 1994 ; Wu et al., 1999).

Les mécanismes ioniques à l'origine de I_{Ti} et responsables des DADs sont :

1. Le courant cationique non-sélectif I_{ns} (Cannell et al., 1986)
2. L'activation de l'échangeur NCX (Fedida et al., 1987 ; Zygmunt et al., 1998)
3. Le courant Cl^- activé par le Ca^{2+} (Laflamme et al., 1996)

1.5.4 Les réentrées

Les réentrées représentent le mécanisme à l'origine de la plupart des tachycardies. Un bloc unidirectionnel, c'est-à-dire un bloc de la conduction dans une direction le long d'un groupe de fibres myocardiques, est nécessaire à la survenue de la plupart des formes de réentrée. Le bloc unidirectionnel dans une partie du circuit laisse ainsi un chemin de retour à travers lequel le même influx peut à nouveau se propager et exciter les zones

qu'il vient juste de traverser (figure 17). Un tel phénomène a reçu plusieurs dénominations : réentrée, excitation réentrante, mouvement circulaire, mouvement réciproque ou encore écho. Une condition supplémentaire pour l'apparition d'une réentrée est la présence d'une zone de conduction lente. L'influx doit alors être suffisamment retardé pour permettre à des régions situées en aval de l'activation de récupérer leur excitabilité (Schmitt et al., 1928).

On a décrit quatre modèles différents de ce type de réentrée : l'anneau, le circuit dominant, le circuit en chiffre huit, et l'onde spirale. Le premier de ces modèles suppose un obstacle anatomique, alors que les autres n'impliquent qu'un obstacle fonctionnel.

Dans ce modèle, si une seule fibre de Purkinje forme 2 branches (**1** & **2**), l'influx électrique va se diviser et être conduit en bas de chaque branche (figure supérieure). Si ces branches forment une branche commune (**3**), les deux influx seront annulés l'un envers l'autre. Si la branche **2** (figure inférieure), par exemple, présente une zone de bloc unidirectionnel (les impulsions se propagent de façon rétrograde mais non orthograde), en aval de cette zone, la fibre **2** est activée à partir de la fibre **1** via la branche commune **3**. L'influx traverse la zone de bloc qui est perméable seulement par voie rétrograde et un mouvement circulaire s'amorce (ligne bleue). À l'intérieur de la zone bloquée (gris), la vitesse de conduction est réduite à cause de la dépolarisation. Lorsque l'impulsion sort de cette zone de bloc, si elle tombe sur un tissu excitable, alors elle (la réentrée) sera conduite dans la branche **1**. Si l'impulsion sort de la zone de bloc et tombe sur un tissu inexcitable (pendant sa PRE), alors elle s'éteindra. Donc, la synchronisation est critique pour que la sortie de l'impulsion de la zone du bloc puisse trouver un tissu excitable pour continuer à se propager (Antzelevitch et al., 1981).

La durée de la repolarisation seule ne permet cependant pas d'appréhender complètement la complexité des mécanismes des arythmies réentrantes. En effet, l'hétérogénéité spatiale et topographique des durées de repolarisation peut constituer un substrat fonctionnel de réentrée (Kuo et al., 1983). En effet, une cellule avec une durée du PA court pourra être dépolarisée (car sortie de sa période réfractaire) mais cette dépolarisation ne pourra pas être conduite à une cellule proche caractérisée par une durée du PA longue qui ne serait pas encore sortie de sa période réfractaire. Cette absence de dépolarisation va pouvoir être à l'origine d'un bloc fonctionnel de conduction qui, en

raison de son caractère temporaire, pourra être unidirectionnel, créant ainsi un substrat de réentrée. Il a été montré, dans l'infarctus du myocarde, que la réentrée pouvait être uniquement fonctionnelle secondairement à la dispersion spatiale des périodes réfractaires (Gough et al., 1985).

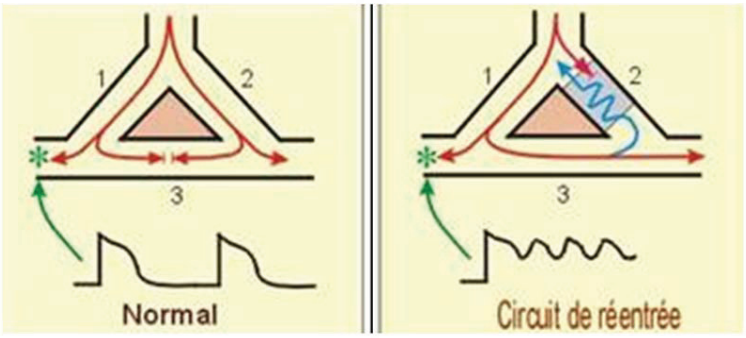

Figure 17 **:** *Modèle de l'anneau pour la réentrée.*

1.5.5 Le rôle de l'hétérogénéité électrique

Le myocarde ventriculaire n'est pas homogène, mais est constitué d'au moins trois types de cellules différentes au plan électrophysiologique : cellules sous-épicardiques, sous-endocardiques et cellules M. La différence essentielle des cellules M par rapport aux cellules sous-endocardiques et sous-épicardiques porte sur un allongement important du PA lorsque les courants I_{to}, I_{Kr} et I_{Ks} sont déprimés (Volders et al., 1999 ; Liu et al., 1995), et des DADs apparaissent lors de surcharges de Ca^{2+} intracellulaire, au même titre que dans les cellules de Purkinje. Les influences du système nerveux autonome et les phénomènes lésionnels quels que soient leur origine, sont des facteurs arythmogènes essentiels, capables d'induire une arythmie de type réentrant ou autre. La durée de la phase 3 du PA joue évidemment un rôle important puisqu'elle conditionne le retour à l'excitabilité aussi bien que la conduction.

1.5.6 Rôle du système nerveux autonome

Le système nerveux végétatif ou nerveux autonome est souvent considéré comme le chef d'orchestre en physiologie. Son importance est particulièrement nette en électrophysiologie et en rythmologie : le système nerveux autonome est responsable de

réponses immédiates, à court terme, mais aussi d'adaptations à moyen terme voire à long terme, selon ses diverses composantes, adrénergiques (α et β adrénergiques) et parasympathiques. Au niveau pariétal, la distribution entre le sympathique et le parasympathique n'est pas du tout homogène. Au contraire, le sympathique aborde la paroi de façon épicardique, tandis que le parasympathique a une distribution préférentiellement sous-endocardique, après avoir traversé la paroi au niveau du sillon atrio-ventriculaire. Cette asymétrie de la distribution transmurale entre sympathique et parasympathique explique les conséquences neuro-végétatives des lésions myocardiques anatomiques, qu'il s'agisse d'un infarctus, ou d'une cardiomyopathie primitive : ces lésions peuvent donc s'accompagner de dénervation partielle (Zipes, 2008).

Les médiateurs du système sympathique sont la noradrénaline et l'adrénaline. Cette dernière stimule les récepteurs β1 et β2-adrénergiques. L'activation des récepteurs β (surtout β1) va entrainer une activation de la cascade protéine Gs-Adenyl cyclase-AMPc-Protéine Kinase A qui va aboutir à une phosphorylation de certains canaux ioniques.

Le neuromédiateur du système parasympathique (ou vague) est l'acétylcholine qui va stimuler les récepteurs muscariniques (surtout M2) qui, via la protéine Gi, vont entrainer une activation des canaux potassiques générant I_{KAch} et un effet indirect d'inhibition de l'AMPc et d'I_{CaL} qui est donc diminué. L'activation parasympathique va donc diminuer la phosphorylation des canaux ioniques et avoir un effet par la diminution ou antagonisme de l'effet de la stimulation des récepteurs β (pour les récepteurs β1).

De nombreux courants ioniques sont augmentés par la stimulation β-adrénergique : courants entrants (I_{CaL}, I_f, I_{st}), sortants (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Kur}, $I_{K,ATP}$), I_{Gap} et libération du Ca^{2+} par RYR2 ; seuls les courants I_{to} et I_{K1} sont inhibés par la stimulation β-adrénergique. 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).

Le système sympathique va donc raccourcir la durée de la repolarisation ventriculaire par l'accélération de la fréquence cardiaque et l'augmentation du courant repolarisant I_K, directement mais aussi indirectement car I_{Ks} est également activé par l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (Viswanathan et al., 1999),

elle-même induite par l'augmentation de I_{CaL} secondaire à l'activation sympathique. Au niveau atrial, à la fois la stimulation sympathique et la stimulation parasympathique vont raccourcir la durée du PA. Au niveau ventriculaire, la stimulation sympathique raccourcit la durée de la repolarisation alors que le parasympathique s'oppose à l'effet du sympathique mais est sans effet en absence de stimulation adrénergique (antagonisme accentué) (Nattel et al., 1981).

Les DADs surviennent dans des conditions de surcharge calcique, dont le modèle le plus ancien était l'intoxication digitalique. La stimulation des récepteurs β1-adrénergiques va augmenter la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui, à son tour, va activer NCX dans le sens d'une sortie de Ca^{2+} et donc prolonger la durée du plateau du PA (phase 2). Cet allongement supplémentaire de la durée du PA va permettre à I_{CaL} de récupérer de son inactivation et de se réactiver et entrainer une nouvelle dépolarisation. Le système sympathique peut donc favoriser à la fois les EADs et les DADs et servir de gâchette arythmique.

Les arythmies, qui mettent au cause des activités déclenchées associées aux EADs sont, elles aussi, sensibles à la stimulation adrénergique, mais leur modulation est plus complexe, bi-phasique. L'apparition d'EAD nécessite des PA longs, favorisés par les cycles lents et une baisse des courants potassiques sortants (médicaments, déficits potassiques) ; il s'y associe une surcharge calcique, avec des courants calciques supports des EADs. La stimulation adrénergique favorise la surcharge calcique et facilite l'apparition des EADs, mais dans le même temps la stimulation adrénergique accélère la fréquence, permettant ainsi un raccourcissement des PA et donc une suppression des EAD.

L'hétérogénéité de la distribution spatiale des différents types de canaux ioniques est à la base de la dispersion des périodes réfractaires (Liu et al.,1993). Une activation sympathique topographiquement homogène va donc avoir des amplitudes d'effets différentes en fonction de la densité d'un canal donné. Ainsi, le SNA va également pouvoir moduler le substrat arythmogène constitué par l'hétérogénéité spatiale des durées de repolarisation.

1.6 Tachyarythmie induite par l'ischémie myocardique

L'ischémie myocardique aiguë est associée avec une incidence élevée des arythmies ventriculaires sévères dans les quelques minutes suivant l'obstruction coronaire. En grande partie, l'hétérogénéité dans la récupération de l'excitabilité dans le myocarde ischémique est considérée comme un substrat électrophysiologique sous-jacent de grands mouvements des circuits instables qui provoquent une excitation réentrante. Ce mécanisme soutient les rythmes ventriculaires rapides au cours de la tachycardie ventriculaire ainsi que le développement de la fibrillation ventriculaire. Le flux de courant dans la zone frontalière entre le myocarde ischémique et normal a été proposé comme l'un des sites d'origine des activités extrasystoliques. Le remodelage électrique est le plus important dans la zone frontalière où les gradients de potentiel entre les cellules ischémiques dépolarisées et les cellules normales du myocarde à proximité est la plus grande (Janse et al., 1980).

Au niveau cellulaire, les perturbations de l'homéostasie ionique, la dépression de l'amplitude du PA, et less perturbation de la communication intercellulaire qui contribuent aux changements de propagation de l'influx, ainsi que la dispersion de la repolarisation, sous-tendent la vulnérabilité accrue aux arythmies sévères. L'augmentation de la dispersion de la repolarisation est due à des différences dans la repolarisation entre les zones ischémiques et normales ainsi qu'à l'accentuation de l'hétérogénéité de la repolarisation transmurale.

Malgré des changements similaires du PR dans le myocarde sous-endocardique et sous-épicardique, l'ischémie diminue l'amplitude du PA et raccourcit sa durée de façon plus importante dans le myocarde sous-épicardique que dans le myocarde sous-endocardiaque (Kimura et al., 1986). Les facteurs contribuant à la dispersion du PA comprennent les différences dans la réponse membranaire des cellules endocardiques versus épicardiques (Gilmour et al., 1980), une plus grande sensibilité de $I_{K,ATP}$ à l'épuisement de l'ATP intracellulaire (Furukawa et al., 1991), une dépression plus grande de I_{CaL} (Kimura et al., 1991) et une diminution de I_{to} dans le myocarde sous-épicardique, conduisant ainsi à une abréviation plus importante de la durée du PA sous-épicardique par rapport au myocarde sous-endocardique au cours de l'ischémie (Lukas et al., 1993).

Un modèle murin d'infarctus du myocarde a été décrit en 1978 par Zolotareva et al. L'occlusion partielle (53% de la lumière) entraine une détérioration de la fonction ventriculaire, une dilatation de la cavité ventriculaire gauche (1.5 fois), un amincissement de la paroi du ventricule gauche, ainsi qu'une hypertrophie des cardiomyocytes (40%) et fait apparaitre de nombreuses régions de fibrose réparatrice (Li et al., 1997). L'occlusion totale entraine un infarctus massif de la paroi libre du ventricule gauche (Ducharme et al., 2000; Trueblood et al., 2001) (figure 18). La mortalité est inférieure à 30% (Lutgens et al., 1999), elle prédomine à la phase aiguë postopératoire. Des modèles d'ischémie-reperfusion peuvent être aussi réalisés. Dans ce cas, l'ischémie induite par ligature est levée après 30 à 60 minutes, avant fermeture du thorax (Michel et al., 1995; Jackson et al., 2001).

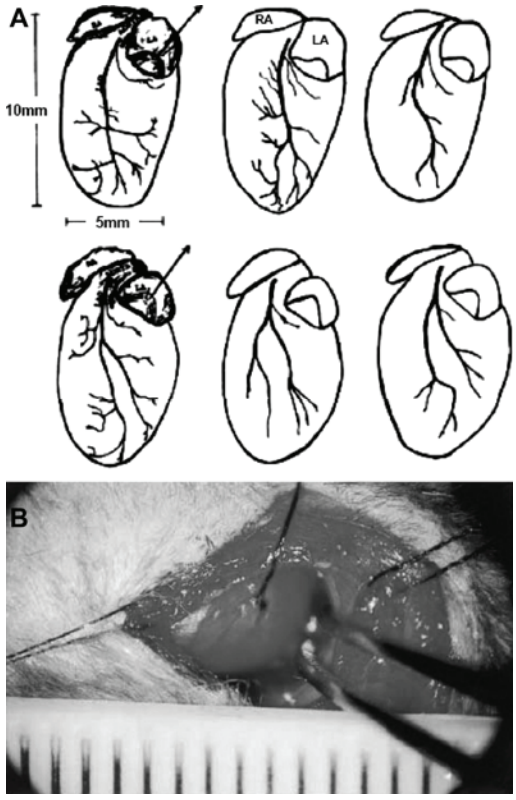

Figure 18 *: A, Variabilité dans l'anatomie de l'artère coronaire gauche chez la souris (Michael et al.,1995). B, Ligation permanente de l'artère coronaire gauche afin de créer un infarctus du myocarde chez la souris (Patten et al., 1998).*

1.7 Les troubles du rythme dans la dysplasie arythmogène ventriculaire droite

La dysplasie arythmogène ventriculaire droite (DAVD) est une cardiomyopathie du ventricule droit caractérisée par une infiltration adipeuse du myocarde avec persistance de fibres myocardiques survivantes entourées d'une fine fibrose (Fontaine et al., 1999). Elle entraîne une dilatation ventriculaire droite, localisée puis diffuse, et tardivement des manifestations d'IC. Elle peut être associée à une atteinte ventriculaire gauche. Son origine est génétique.

Elle a d'abord pour conséquence des anomalies électriques souvent visibles sur les dérivations précordiales droites de l'ECG. Il s'agit de troubles de conduction localisés du ventricule droit se manifestant par un élargissement de la fin du QRS dans cette dérivation et des micro-potentiels terminaux appelés ondes epsilon, mieux visibles sur un ECG à haute amplification. Il peut s'agir d'un bloc de branche droit typique, mais avec élargissement de sa partie terminale (« bloc plus que droit ») témoignant d'un bloc pariétal. Les ondes T sont inversées en précordiales droites pour les formes étendues. Son diagnostic repose sur l'association de ces anomalies électriques et d'anomalies morphologiques du ventricule droit mises en évidences par des méthodes d'imagerie invasives et non invasives (McKenna et al., 1994). La DAVD se manifeste essentiellement par un spectre d'arythmies ventriculaires qui démasquent la maladie, extrasystoles, tachycardies ventriculaires ou fibrillation ventriculaire qui peut être la première manifestation de la maladie. L'incidence de la maladie dans la population générale, paraît basse, estimée entre un et deux pour 10 000, et l'incidence de la mort subite est évaluée à 1 à 3% par an dans la DAVD connue.

La DAVD est en particulier une cause majeure de mort subite du sujet jeune. Les cas rapportés dans la littérature ont le plus souvent moins de 35 ans, et dans la moitié des cas cet accident est lié à l'exercice ou à l'émotion (Basso et al., 1999). Le mode de décès des patients atteints de dysplasie n'est pas limité à la mort subite. En effet il s'agit d'une cardiomyopathie évolutive, avec une IC globale terminale. La DAVD est généralement causée par des mutations héréditaires des protéines desmosomales (Moric-Janiszewska et al., 2007). Le desmosome est une jonction structurelle qui connecte des cardiomyocytes, et qui transmet la force de contraction d'une cellule à l'autre (MacRae et al., 2006). Le desmosome est composé de protéines intracellulaires et extracellulaires, y compris la

desmoplakine, la desmocolline, la desmogléine, la plakophiline 2 et la plakoglobine (Marcus et al., 2006) (figure 19). Ces protéines se lient aux filaments intermédiaires des cardiomyocytes et à la N-cadhérine dans un complexe qui lie les cardiomyocytes ensemble par des filaments intermédiaires (Stokes, 2007). Les mutations dans plusieurs de ces protéines déstabilisent la jonction du desmosome, conduisant à la séparation physique des cardiomyocytes et l'induction de l'apoptose. Le remodelage du ventricule comprend une augmentation de la fibrose et souvent un développement de tissu adipeux, qui remplace progressivement le myocarde des ventricules. La DAVD est habituellement associée en clinique à des tachycardies ventriculaires monomorphes. L'hypothèse du mécanisme arythmogène dans la DAVD est un bloc de conduction et la formation de circuits de macro-rentrées qui sont causées par la fibrose résultant d'une déhiscence (rupture anormale) du desmosome (Wolf et al., 2008).

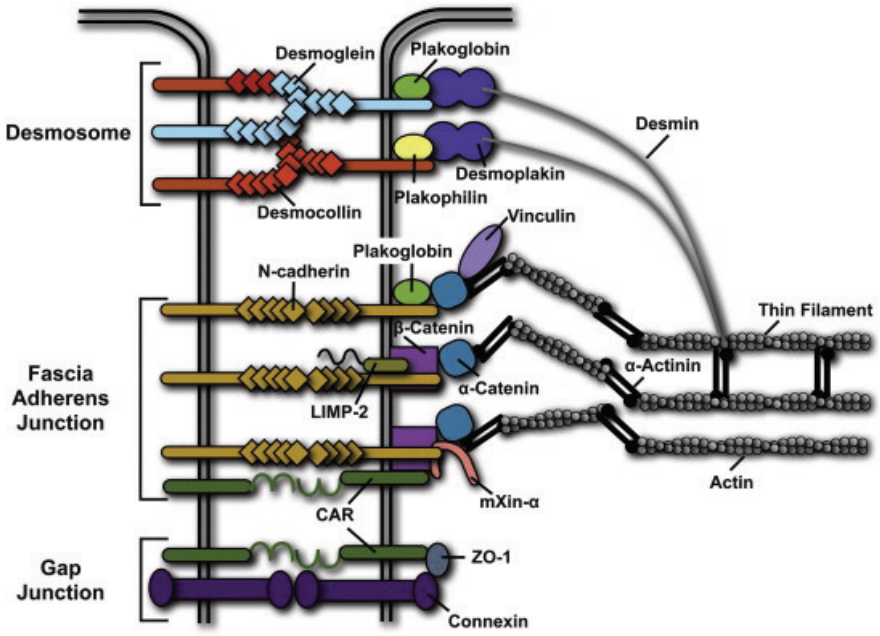

Figure 19 *: Schèmes des complexes majeurs et des composants trouvés au niveau du disque intercalaire cardiaque (Sheikh et al., 2009).*

La suppression spécifiquement cardiaque du gène codant la desmoplakine (DSP) entraîne une altération de la morphogenèse cardiaque et provoque la mort embryonnaire des souris knock-out homozygotes. Les souris hétérozygotes déficientes en DSP, cependant, présentent une augmentation des adipocytes et de la fibrose, une augmentation

de l'apoptose, une altération de la contractilité cardiaque et des arythmies ventriculaires, rappelant le phénotype de DAVD chez les humains (Garcia-Gras et al., 2006). La plakophiline 2 (Pkp2) est le seul membre de la famille plakophiline exprimé dans le cœur, et sert à la liaison des protéines desmosomales. Les embryons des souris déficientes en Pkp2 présentent une morphogenèse cardiaque anormale, suivie par des hémorragies, une rupture cardiaque et la mort autour de E11.5. Cette évaluation des cœurs embryonnaires a révélé un amincissement des parois ventriculaires et la formation d'anévrismes, qui sont également observés chez les patients atteints de DAVD (Grossmann et al., 2004).

Une étude de Kostetskii et al., (2005) a démontré que l'invalidation spécifique cardiaque de la N-cadhérine (CKO) chez la souris conduit au désassemblage du disque intercalaire et peut entraîner une mort subite. Il y a une réduction significative de la Cx43 des ventricules dans le cœur de la souris CKO N-cadhérine ; c'est une cause importante de la diminution de la vitesse de conduction intra-ventriculaire. En outre, les souris CKO N-cadhérine présentent une diminution de leur débit cardiaque avec une dilatation modeste des oreillettes ainsi que du ventricule gauche. Par conséquent, la N-cadhérine est une des molécules d'adhésion cellulaire responsables du maintien d'un lien mécanique et électrique entre les cardiomyocytes. La sévérité du phénotype des souris CKO N-cadhérine a suggéré qu'une réduction de la N-cadhérine pourrait affecter l'organisation des jonctions *gap*, générant ainsi un substrat arythmogène. De plus, les souris hétérozygotes présentent une sensibilité accrue aux arythmies induites accompagnée d'une réduction de Cx43. Ces données fournissent la première preuve génétique que la N-cadhérine et la Cx43 fonctionnent ensemble pour maintenir le couplage électrique normal dans le cœur (Li et al., 2007).

La plakoglobine (Jup) est une autre protéine essentielle du desmosome qui, lorsqu'il est absent, peut entraîner un phénotype de type DAVD chez la souris. Les souris haplo-insuffisantes Jup+/- développent une dilatation du ventricule droit, une réduction de la fonction cardiaque ainsi que des extrasystoles ventriculaires spontanées. Toutefois, selon l'histologie et des analyses en microscopie électronique, il n'y pas de preuve de changement dans la structure du myocarde ou l'apparence des desmosomes, ce qui suggère que les souris Jup+/- imitent partiellement les traits cliniques de la DAVD

(Kirchhof et al., 2006). Cependant, une étude récente a montré que la Plakoglobine est diminuée dans le ventricule droit et le septum interventriculaire des patients atteints de DAVD. C'est pourquoi des analyses immunochimiques de la plakoglobine sont maintenant effectuées en routine afin d'améliorer le diagnostic précoce des patients DAVD (Asimaki et al., 2009).

Des mutations du gène du récepteur à la ryanodine de type 2 (RYR2) ont été proposées comme une cause de DAVD, bien que cette association ait été mise en doute par la suite par plusieurs groupes (Dokuparti et al., 2005 ; Wehrens, 2007). Ces patients développent généralement une tachycardie ventriculaire provoquée par l'exercice ou l'émotion, souvent appelée tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique, ou CPVT. La plupart des patients CPVT ont un cœur structurellement normal, même s'il peut se développer une cardiomyopathie modérée avec une pénétrance incomplète. Étant donné son rôle unique dans le déclenchement des arythmies ventriculaires par l'exercice sans preuve significative de cardiomyopathie, il est probable que ce syndrome causé par des mutations RYR2 représente une entité distincte des DAVDs (Tiso et al., 2001). D'autres recherches sont nécessaires pour définir la contribution exacte de RYR2 dans des cardiomyopathies du type DAVD, et afin de déterminer s'il existe une relation directe ou indirecte des liens ultra-structuraux entre les desmosomes et le RS.

La kinase liée aux intégrines (Integrin linked kinase – ILK) est une kinase de type sérine473/thréonine308 qui joue un rôle important dans différentes voies de signalisation, dans la mécano-transduction (lien entre le complexe macromoléculaire du pont d'acto-myosine à la membrane cellulaire) ainsi que dans la structure cellulaire (le cytosquelette) via un grand nombre de protéines qui constituent une partie de la machinerie moléculaire complexe avec les intégrines à la face cytoplasmique. Les progrès récents en physiologie cardiaque ont identifié ILK comme une protéine essentielle dans la régulation de la croissance cardiaque (Hannigan et al., 2005; Frey et Olson, 2003; Chen et al., 2005), de la contractilité (Bendig et al., 2006), ainsi que de la réparation post-infarctus du myocarde (Bock-Marquette et al., 2004). Par conséquent, une suppression (un knockout conditionnel en utilisant le système Cre/Lox) spécifique d'ILK dans le cœur de souris provoque une cardiomyopathie dilatée spontanée et des morts subites dès l'âge de 6 à 12 semaines (White et al., 2006). Cependant, la cause de la mort subite précoce chez les

souris KO-ILK ainsi que son rôle potentiel dans le processus de remodelage électrique et la susceptibilité aux arythmies reste inconnue. Les intégrines relient la matrice extracellulaire au sarcomère contractile aux jonctions costamériques (figure 20). Les cardiomyocytes ventriculaires des souris KO-ILK sont caractérisés par une désorganisation massive des myofilaments épais et fins et une perte de l'intégrité du cytosquelette. En revanche, une invalidation génétique de mélusine cause une cardiomyopathie dilatée non spontanée, qui se développe dans la réponse aux autres facteurs de stress hémodynamique comme une surcharge de pression (modèle de coarctation aortique par exemple). A l'état de base (sans stress hémodynamique), l'architecture des cellules des souris KO-Mélusine est normale (Brancaccio et al., 2003). Dans le modèle du poisson-zèbre, la mutation ILK^{L308P} (*msq* muté) perturbe l'association d'ILK/Parvin B et provoque une dysfonction de la contractilité cardiaque (Bendig et al., 2006). Ce résultat suggère que le complexe ILK-Parvin B joue un rôle important dans la régulation de la contractilité cardiaque.

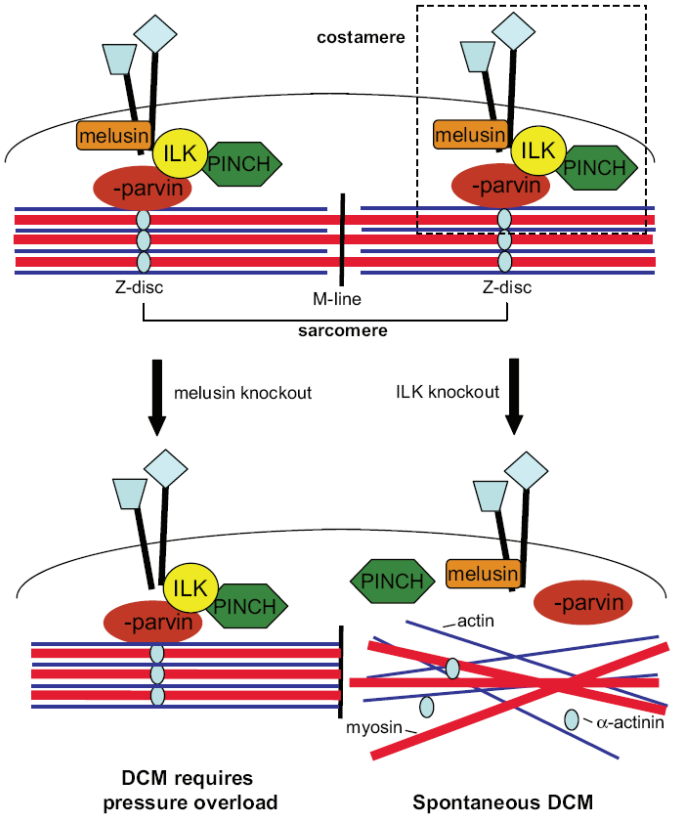

Figure 20 *: Une altération dans l'interaction entre la β1-intégrine avec ILK et la mélusine aux jonctions du costamère peut causer une dysfonction cardiaque et le développement d'une cardiomyopathie dilatée (Hannigan et al., 2007).*

1.8 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) a montré que celui-ci avait 80% d'homologie avec le génome humain. 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. Par des 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 (Wu et al., 2008; Ludwig et al., 2008). 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 se sont avérées décevantes en tant que modèle animal car ne elles ne présentaient pas le phénotype attendu 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 1.5mm. Son volume d'éjection est compris entre 25 et 40 µl, 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 semble exister des connections 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 États-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).

Les propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques de souris diffèrent de celles de l'homme (figure 21). Ainsi, il est important de noter que les formes des PA dans les cardiomyocytes murins sont distincts de ceux des grands animaux, y compris les humains, suggérant des différences propres à chaque espèce dans l'expression et/ou les rôles fonctionnels des différents courants ioniques, en particulier potassiques (figure 21). Dans le cœur de souris adulte, l'expression de l'ARNm de KCNQ1 est élevée (Demolombe et al., 2001), alors que celle de KCNE1 est faible (Felipe et al., 1994), et les études électrophysiologiques ont échoué à détecter I_{Ks} dans les cardiomyocytes ventriculaires (Babij et al., 1998; Xu et al., 1999). De même, l'expression de m-erg (KCNH2) est élevée dans les ventricules de souris adultes, bien que la densité de courant I_{Kr} soit est faible (Pond et al., 2000). Ces observations suggèrent que les courants potassiques I_{Kr} et I_{Ks} ne sont pas des courants de repolarisation importants dans le cœur de souris adulte (Wang et al., 1996). A l'inverse, les courants de repolarisation I_{ss} et I_{Kslow}

des cellules ventriculaires de souris, ne semblent pas être présents dans les ventricules de l'Homme.

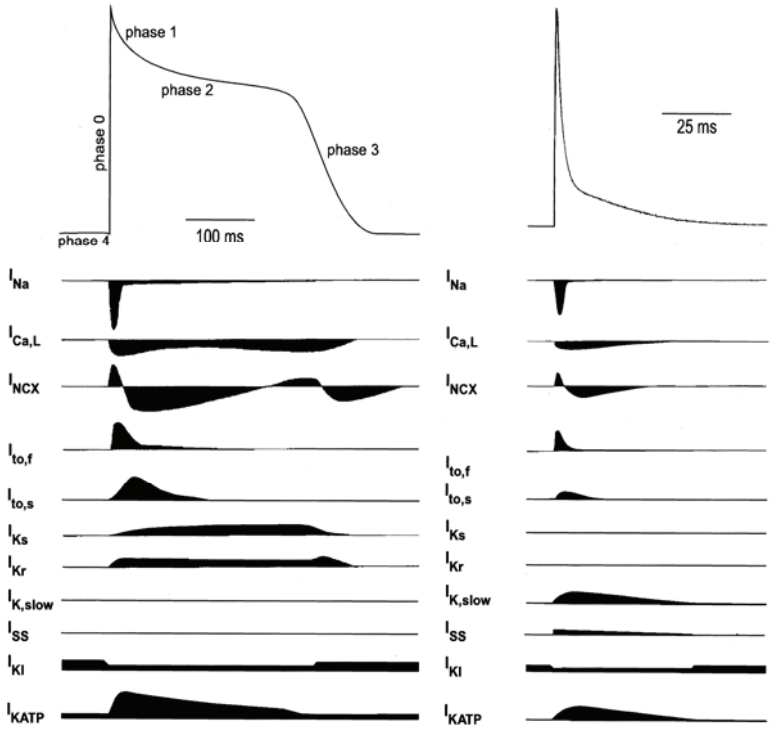

Figure 21 *: Schéma des potentiels d'action et des courants ioniques impliqués dans ceux-ci dans des myocytes ventriculaires adultes humains (à gauche) et murins (à droite), (Nerbonne et al., 2001).*

Les électrocardiogrammes (ECG) de l'Homme et de la souris partagent un certain nombre de similitudes, mais montrent aussi des différences importantes (figure 22). Au cours du rythme sinusal, les ECG obtenus à partir des deux espèces montrent une onde P, ce qui représente la dépolarisation auriculaire, dont la durée est entre 12 à 20 ms chez la souris et peut atteindre 100 ms chez l'Homme. Elle est suivie par un retour à la ligne isoélectrique qui reflète la conduction auriculo-ventriculaire (espace PR) dans les deux espèces. Le complexe QRS, qui représente la dépolarisation ventriculaire, est cinétiquement similaire chez les deux espèces. L'ECG normal de souris montre ensuite une onde J prépondérante (Liu et al., 2004), qui est souvent subtile chez l'Homme, sauf dans des conditions pathologiques comme l'hypothermie (Osborn, 1953) ou une

l'hypercalcémie (Sridharan et Horan, 1984). Par rapport à la repolarisation ventriculaire chez l'Homme, il n'existe pas de segment ST isoélectrique chez la souris et de plus, l'onde T de la souris est biphasique avec une première vague de J positive rapide et continue par l'onde T négative plus lente. La fin de l'onde T a été définie comme le moment où la composante lente de cette onde retourne à la ligne isoélectrique.

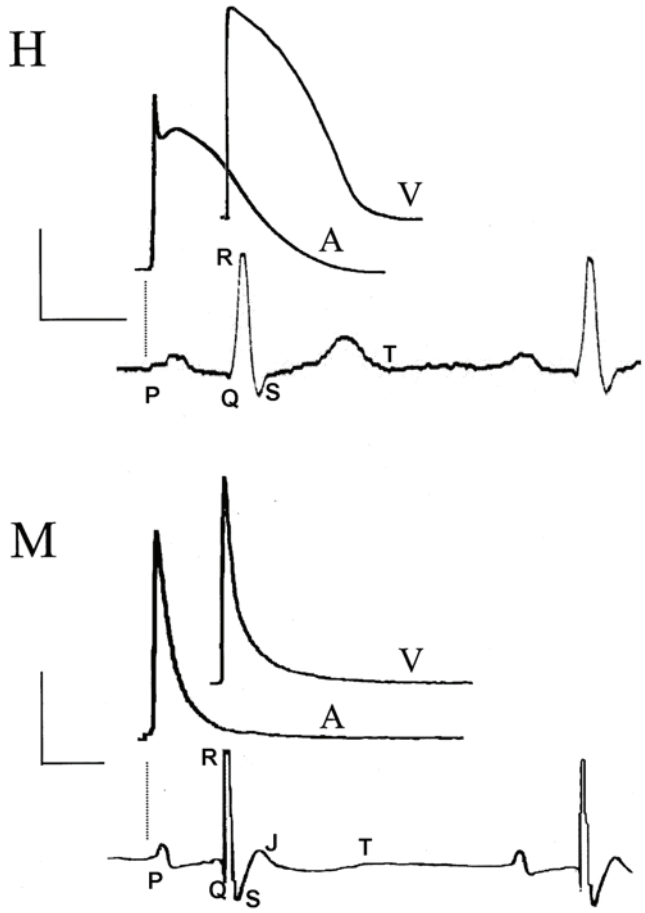

Figure 22 *: Comparaison des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains (H, en haut) et murins (M, en bas) et électrocardiogrammes correspondant. Les potentiels d'action transmembranaires, ont enregistré sur des myocytes endocardiques à l'aide de microélectrodes intracellulaires, sont tracées par rapport à l'ECG de surface normale. Les barres verticales: 50 mV; barres horizontales: 250 ms (Homme) et 25 ms (souris), (Nerbonne et al., 2001).*

1.9 Etude électrophysiologique chez la souris

Les études électrophysiologiques ont pour but d'explorer l'activité électrique du cœur. Elles fournissent au clinicien ainsi qu'au chercheur des informations sur les propriétés fonctionnelles des tissus cardiaques. Elles l'éclairent sur la nature des troubles du rythme cardiaque et les possibilités de traitement.

La détermination des intervalles de conduction fait appel au recueil du potentiel du faisceau de His. Le signal enregistré permet de séparer les temps de conduction correspondant à la traversée des différentes structures spécialisées de la jonction auriculo-ventriculaire : le nœud AV et le système de His-Purkinje. Jusqu'alors on ne disposait que de l'espace PR mesure sur l'ECG de surface. Or celui-ci évalue globalement le temps mis par l'impulsion cardiaque issue du nœud SA à atteindre le myocarde ventriculaire. L'électrocardiographie intracardiaque, en fournissant cette information, a joué un rôle décisif dans la connaissance des troubles du rythme et de la conduction cardiaque.

Les modèles animaux de trouble électrophysiologiques ont contribué à la compréhension des mécanismes associés à la maladie cardiaque chez l'Homme. Plusieurs modèles murins de maladies humaines avec des conséquence électrophysiologiques cardiaques ont été développés, y compris des modèles de troubles familiaux de conduction (Kasahara et al., 2001; Schott et al., 1998), de cardiomyopathies hypertrophiques familiales (Geisterfer-Lowrance et al., 1996; Yang et al., 1999), de syndrome du QT long congénital (Drici et al., 1998), et des défauts de jonction gap (Hagendorff et al., 1999; Reaume et al., 1995). Ces modèles murins présentent notamment des anomalies électrophysiologiques qui peuvent être caractérisés par des techniques électrophysiologiques *ex vivo* et *in vivo*. La signification physiologique des modifications génétiques qui ont été précédemment caractérisées uniquement au niveau cellulaire ou moléculaire peut maintenant être étudiée dans des organes entiers, ou chez l'animal intact.

L'enregistrement sur un cœur isolé et perfusé par le système de Langendorff fournit aux physiologistes une possibilité d'étudier le cœur comme un organe isolé, sans l'influence du système nerveux autonome. Il permet également la régulation fine de son milieu immédiat en termes de changement des compositions, du pH, de la température, du contenu de l'oxygène, de la concentration des médicaments et, tout simplement en

modifiant la composition du liquide de perfusion qui est fournie par le système Langendorff. L'électrocardiogramme (ECG) est obtenu à partir des enregistrements des aiguilles électrodes placées dans le myocarde, et on peut enregistrer les électrogrammes auriculaires et ventriculaires et ainsi que des stimulations programmées en utilisant des électrodes de stimulation (Guerrero et al., 1997; Thomas et al., 1998).

La technique d'exploration endocavitaire chez la souris a été développée pour la première fois par l'équipe de Berul, Boston - USA en 1996. Notre laboratoire à Nantes en France a développé et appliqué une technique d'électrophysiologie cardiaque *in vivo* chez la souris afin d'évaluer directement le rôle des implications en rythmologie des produits de gènes spécifiques dans les changements de conduction cardiaque ainsi que la survenue des arythmies sévères comme la fibrillation auriculaire (Royer et al., 2004), les blocs de conduction AV (Mangoni et al., 2006; Piron et al., 2008) et les tachycardies ventriculaires (Ouvrard-Pascaud et al., 2005; Gellen et al., 2008; Aubin et al., 2010). Ces études sont basées sur les protocoles de stimulation cliniques en rythmologie humaine et permettent une évaluation des caractéristiques de la conduction du cœur de la souris par une approche endocardique, y compris l'évaluation de la réponse électrophysiologique à la stimulation programmée et des agents pharmacologiques. De ce fait, nous avons utilisé des cathéters octapolaires, de 1.2F à 2F, introduit en percutané par la veine jugulaire droite. Les électrodes sont capables de détecter et de transmettre l'activité électrique produite à l'intérieur du cœur. Les enregistrements sont effectués sur le mode bipolaire.

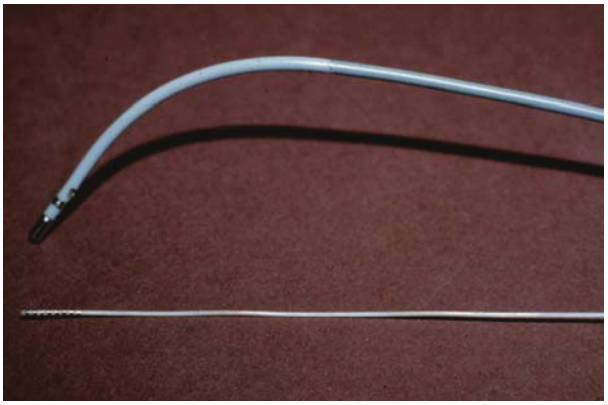

Figure 23 *: Un cathéter 2F octapolaires pour les utilisations dans l'étude électrophysiologique chez la souris (en bas) en comparaison avec un cathéter*

électrophysiologique standard 5F bipolaire (en haut) utilisées dans les études cliniques humaines (Berul, 2003).

Les signaux recueillis correspondent à une différence de potentiel entre deux électrodes. Chez l'Homme, une fois introduit, le cathéter est poussé sous contrôle radioscopique dans la veine cave inferieure puis l'oreillette droite, en revanche, chez la souris, il faut le faire « en aveugle », sans contrôle radioscopique, mais en surveillant les signaux d'ECG et d'ECG intracardiaque sur l'écran de l'ordinateur afin de déterminer la position du cathéter. Surtout, entre les deux activités auriculaire et ventriculaire, est recueilli d'abord un potentiel bref proche du ventriculogramme que l'on rapporte à la dépolarisation de la branche droite du faisceau de His (figure 24). A cet endroit, l'activité auriculaire est au moins aussi ample que celle du ventricule. Ainsi trois électrogrammes successifs sont enregistrés dans la dérivation du faisceau de His : Auriculaire (A), hisien (H) et ventriculaire (V).

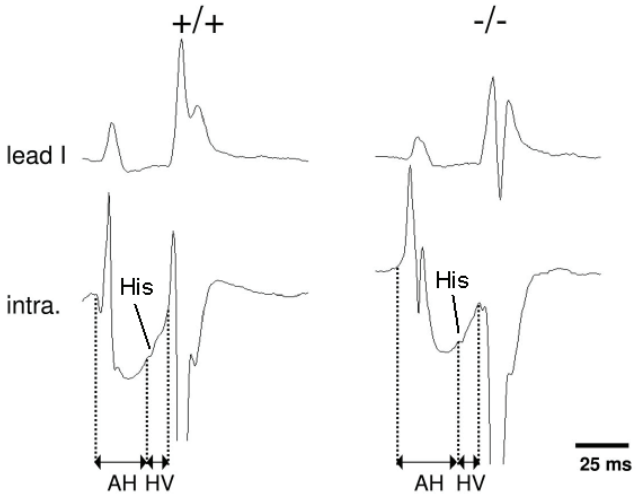

Figure 24 *: Les intervalles AH et HV mesurées chez les souris sauvages (à gauche,+/+) par rapport aux souris KO-Cav3.1 (à droit, -/-). Nous avons constaté un allongement de l'intervalle AH chez les souris KO-Cav3.1. Lead I : l'ECG de surface D1, intra : électrogramme intracardiaque (Mangoni et al., 2006).*

Les études électrophysiologiques chez la souris permettent, comme chez l'homme, de déterminer un certain nombre de paramètres électrophysiologiques caractérisant la fonction du nœud sinusal (le temps de récupération du sinus), les propriétés de

conduction du nœud AV (phénomène de Wenckebach) ou encore les périodes réfractaires, en complément des paramètres de l'ECG de surface. Mais elles permettent aussi, à l'aide de protocoles précis de stimulation de déclencher des arythmies (figure 25 et 26).

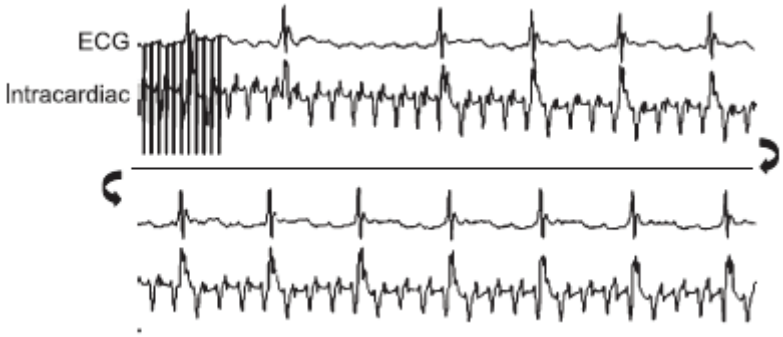

Figure 25 *: La fibrillation auriculaire induite par une stimulation rapide (burst pacing) chez une souris sauvage. Noter l'aspect fibrillatoire caractéristique de l'activité atriale, ainsi que l'accélération et l'irrégularité des complexes QRS (Royer et al., 2004).*

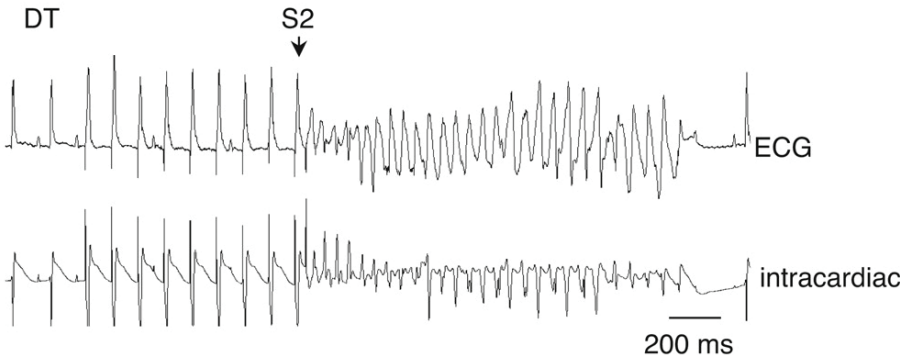

Figure 26 *: La tachycardie ventriculaire polymorphique induite par une stimulation programmée chez une souris transgénique surexprimée de récepteur des minéralocorticoïdes (Ouvrard-Pascaud et al., 2005).*

En général, le but ultime des travaux de recherche est l'amélioration de notre connaissance du rôle des gènes dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires associées avec des arythmies. L'utilisation des modèles murins transgéniques est vraiment importante dans la recherche des mécanismes de troubles du rythme cardiaque. Cependant, il faut tenir compte des différences de propriétés électrophysiologiques non

seulement entre les espèces (homme-souris, voir plus haut), mais aussi entre les différents fonds génétiques de souris qui présentent des variations importantes de leurs paramètres électrophysiologiques et de leur susceptibilité aux arythmies.

1.10 Création de souris génétiquement modifiées

1.10.1 Transgénèse additionnelle par micro-injection pronucléaire :

Cette méthode consiste en l'introduction par micro-injection d'un ADN dans le pronucléus d'un œuf fécondé (Gordon et al., 1980). Dans la plupart des cas, l'intégration du transgène ayant lieu au stade unicellulaire, il se retrouve présent dans toutes les cellules des souris transgéniques, y compris les cellules germinales.

La première étape consiste en la fabrication du vecteur contenant le transgène d'intérêt. Il est important de pouvoir distinguer les produits (ARN et protéine) du transgène de ceux du gène endogène en insérant un obligonucléotide dans la partie non traduite du gène ou en ajoutant une séquence codant pour un peptide reconnu par un anticorps spécifique.

La deuxième étape consiste à micro-injecter le transgène dans le pronucléus d'un embryon fraîchement fécondé. Les embryons sont isolés, lavés, sélectionnés puis immobilisés par une micropipette de rétention, et le transgène est injecté dans le pronucléus mâle avec une micropipette d'injection. Les embryons sont ensuite remis en culture, puis une dizaine d'entre eux sont réimplantés dans l'oviducte d'une souris femelle pseudogestante. Le résultat global de la micro-injection se traduit par l'obtention d'une à quelques souris transgéniques pour une centaine d'embryons injectés. Le génotype des souris est réalisé par PCR (polymerase chain reaction) à partir de l'ADN caudal de souris à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques du transgène. L'analyse par Southern blot est conseillée pour estimer le nombre de copies du transgène. Les souris transgéniques (F0) sont accouplées avec des souris sauvages pour obtenir la lignée transgénique stable (F1).

1.10.2 Transgénèse ciblée par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonaires (ES) :

Les cellules ES de souris, dont le génome est modifié à l'aide d'un vecteur de recombinaison homologue, peuvent coloniser *in vitro* un blastocyte hôte. La réimplantation d'un tel blastocyte dans une souris pseudogestante donnera naissance à une souris chimère dont la lignée germinale sera potentiellement composée de cellules ES génétiquement modifiées. Les vecteurs de recombinaison homologue permettent de remplacer un allèle d'un gène ciblé par une construction comportant des séquences homologues plus ou moins modifiées. Il est ainsi possible d'inactiver un gène endogène, de le remplacer par une séquence contenant une mutation associée à une maladie génétique, ou d'insérer une séquence complète d'ADNc. Une cassette de sélection contenant classiquement le gène de résistance à la Néomycine est insérée. Elle permettra la sélection des cellules recombinantes. Pour inactiver un gène (knock-out, KO), la cassette de sélection est insérée à la place des premiers exons en incluant également, si l'on veut réaliser une inactivation du gène cible au niveau transcriptionnel, le site d'initiation de la transcription. En général, la cassette de sélection est ajoutée en amont ou en aval de la mutation, dans une partie intronique qui n'est pas impliquée dans l'épissage du gène.

1.10.3 Transgénèse ciblée conditionnelle :

La transgénèse additionnelle et la transgénèse ciblée par recombinaison homologue dans les cellules ES permettent de transmettre du matériel génétique modifié dans la lignée germinale de la souris. Cependant, ces stratégies présentent des limitations liées essentiellement à l'introduction de mutation dans la lignée germinale :

- une mutation germinale peut être létale au niveau embryonnaire et empêcher ainsi l'analyse du phénotype chez la souris ;

- l'inactivation d'un gène ou son remplacement par un allèle muté dans différents lignages cellulaires empêchent l'étude du produit du gène dans un groupe de cellules à un moment donné de la vie animale ;

- les mutations somatiques, comme dans certaines myopathies ou cancers, ne peuvent pas être étudiées avec ces méthodes.

Pour surmonter ces limitations, des vecteurs permettant de faire de la transgénèse ciblée conditionnelle ont été développés (Sauer, 1998). Ces vecteurs sont basés sur la spécificité du système Cre-loxP du bactériophage P1 : ils permettent de faire du ciblage de gènes par recombinaison homologue et offrent la possibilité de réaliser de façon spatiotemporelle l'apparition de la mutation chez la souris. Pour cela, il faut créer deux lignées de souris indépendantes. La première lignée de souris est obtenue par recombinaison homologue et contient le gène-cible « floxé » (altération silencieuse) qui fonctionne normalement. La deuxième lignée de souris est obtenue par transgénèse additionnelle et exprime la recombinase Cre. L'expression de Cre pouvant être soit sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu, soit inductible, soit les deux à la fois, il est alors possible de contrôler l'apparition de la mutation dans un tissu donné et/ou dans le temps. On peut ainsi exercer un contrôle spatiotemporel de l'expression de la mutation. Pour créer des souris transgéniques dans lesquelles l'activité Cre est dépendante d'un médicament, on utilise des séquences régulatrices liées cette fois-ci au Cre modifié (comme Cre-PR ou Cre-ER). Dans ce cas là, les souris produisent les protéines-fusion Cre-ER ou Cre-PR qui ne sont actives que lorsque l'on donne du tamoxifène ou du RU486, respectivement, aux souris. L'activité de la recombinase Cre peut être détectée par croisement des souris transgéniques Cre avec des souris indicatrices, comme la souris transgénique β-actine-loxpCATLoxp-LacZ (Akagi et al., 1997) qui contient le promoteur ubiquitaire β-actine, le gène rapporteur CAT encadré par deux sites loxP, suivi du gène rapporteur LacZ codant pour la β-galactosidase. En l'absence de la protéine Cre, ces souris synthétisent la protéine CAT. La présence de Cre abolit l'expression du gène CAT et active l'expression de LacZ. Cela permet de déterminer les tissus qui expriment la recombinase Cre. Bien évidemment, on peut aussi mettre en évidence la recombinase par l'anticorps anti-Cre sur des coupes congelées (Schwenk et al., 1997).

D'autres systèmes d'induction ont été également développés tels que le système tétracycline, qui peut rendre inductible l'expression de la recombinase Cre (St-Onge et al., 1996). Il existe deux systèmes tétracycline, « Tet-Off » et « Tet-On », basés sur l'expression du gène d'intérêt en l'absence ou en présence de tétracycline ou d'un dérivé de la tétracycline, le doxycycline. Dans le système « Tet-Off », une protéine de fusion trans-activatrice est composée du répresseur de la tétracycline et du domaine activateur

de la protéine virale VP16 du virus de l'Herpes simplex, sous le contrôle du promoteur approprié (spécifique d'un tissu ou d'un type de cellule) ; en l'absence de tétracycline, cette protéine est synthétisée dans un tissu donné, se fixe sur l'élément de réponse à la tétracycline, et transactive l'expression du gène d'intérêt lié à cet élément. Dans le système « Tet-On », une mutation de quatre acides aminés dans le répresseur de la tétracycline change la propriété de fixation ; cette fois, la protéine de fusion est capable de fixer l'élément de réponse à la tétracycline en présence de tétracycline.

1.11 Contexte et objectif du travail de recherche

Les maladies cardiovasculaires représentent toujours la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés avec une prévalence qui augmente rapidement dans les pays en voie de développement, ce qui représente environ 30% de tous les décès dans le monde entier (OMS, 2007). L'hypertrophie cardiaque est la conséquence d'une surcharge de travail du muscle cardiaque conduisant à un processus de remodelage cardiaque. Le cœur s'hypertrophie afin de mieux répondre à la demande. Bien que cette situation soit bénéfique pour l'organisme à court terme, une hypertrophie trop accentuée conduira à long terme, à une insuffisance cardiaque et à la mort. L'hypertrophie cardiaque est associée à un remodelage électrique complexe qui conduit généralement à un allongement du PA ventriculaire, une des causes des arythmies et de la mort subite (Armoundas et al, 2001 ; Hill, 2003). Généralement, le mécanisme causal est la fibrillation ventriculaire, un trouble du rythme cardiaque irréversible dont les mécanismes physiopathologiques sont complexes et méconnus.

Grâce aux progrès récents des études électrophysiologiques *in vivo*, il est aujourd'hui possible de déclencher et d'étudier des troubles du rythme auriculaires (Wakimoto et al., 1996) et ventriculaires (Berul et al., 1996) chez la souris.

Les troubles du rythme sont liés à une altération des propriétés électriques des cellules cardiaques qui sont le plus souvent liés à une modification complexe de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques (remodelage ionique) lors d'une pathologie cardiaque sous-jacente telle que l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie ventriculaire, la dilatation ou l'IC. Plus rarement, les troubles du rythme sont d'origine génétique et résultent de mutations sur des gènes codant des sous-unités de canaux

ioniques ou des protéines de régulation des canaux ioniques (canalopathies cardiaques). Il en est ainsi du syndrome du QT long, du syndrome de Brugada, des tachycardies ventriculaires catécholaminergiques, de formes héréditaires des troubles de la conduction, du syndrome du QT court ou de la dysfonction sinusale.

Si les conséquences fonctionnelles *in vitro* des mutations génétiques ou du remodelage ionique sont relativement simples à étudier ou à prévoir, leur rôle dans les mécanismes physiopathologiques des troubles du rythme *in vivo* sont plus difficiles à appréhender. Parmi les nombreux modèles animaux développés dans le domaine de la recherche sur les troubles du rythme cardiaque, la souris est de plus en plus utilisée en raison de notre capacité à muter, invalider ou sur-exprimer les gènes d'intérêt. Grâce aux progrès récents dans le domaine des études électrophysiologiques *in vivo* avec la miniaturisation des matériels d'investigation invasive, il est aujourd'hui possible de déclencher et d'étudier les troubles du rythme chez la souris alors que cela était considéré comme difficile, voire impossible, jusqu'à récemment en raison d'une masse cardiaque critique de 100-200 mm^2.

L'objectif de mon travail de thèse est de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques dans la physiologie et dans la physiopathologie cardiaque, surtout dans l'implication de la survenue des troubles du rythme *in vivo*. Cinq approches complémentaires ont été développées au cours de ma thèse.

Le premier volet consiste en un modèle d'hypertrophie ventriculaire consécutive à un bloc auriculo-ventriculaire complet après l'ablation du faisceau de His par radiofréquence. Ces animaux présentent un remodelage ionique et des troubles du rythme ventriculaire sévères. Ce modèle a été utilisé pour la mise au point d'un pacemaker biologique via une technique de transfert de gène *in vivo* en utilisant un vecteur synthétique. En effet, bien que le pacemaker électronique soit une thérapie médicale remarquable avec une réduction nette du taux de morbi-mortalité chez les patients atteints de BAV complet ou de dysfonction du nœud sinusal, il présente cependant certains désavantages difficiles à améliorer comme l'adaptation de la fréquence lors d'une émotion ou d'un exercice physique, la taille du matériel, l'interférence de sa fonction avec les stimulateurs neuronaux ou les détecteurs de métaux, etc.… Ainsi, l'application de la thérapie génique ou cellulaire dans la fabrication d'un pacemaker biologique apparait

comme une démarche intéressante de stratégie anti-arythmique. Nous avons utilisé ce modèle de bloc auriculo-ventriculaire complet (**première approche**) dans l'étude du remodelage électrique au cours de la survenue de troubles du rythme ventriculaire, (**deuxième approche**) dans la création d'un pacemaker biologique ventriculaire en utilisant une approche de thérapie génique et **(troisième approche**) dans une étude du rôle de la sous-unité Cav3.1 du courant calcique de type T ($I_{Ca,T}$) dans le pacemaker ventriculaire et la survenue de troubles du rythme ventriculaire.

Le deuxième volet consiste à caractériser les conséquences physiopathologiques de l'invalidation de gènes codant pour des sous-unités de canaux ioniques dans des modèles de souris transgéniques. J'ai ainsi (**quatrième approche**) développé un modèle d'insuffisance cardiaque post-infarctus sur un modèle de souris KO pour le gène *Cacna1g* (Cav3.1), qui code pour la sous-unité canalaire Ca^{2+} de type T (α1G) dont l'expression est essentiellement supraventriculaire et dans le système de conduction (nœud SA, nœud AV et fibres de Purkinje). Actuellement, différentes études ont montré que ce courant $I_{Ca,T}$ n'est présent dans les cardiomyocytes ventriculaires qu'au cours de la période néonatale et qu'il diminue ensuite graduellement jusqu'à l'âge adulte (sauf dans les cardiomyocytes ventriculaires de cobaye). Chez l'Homme, I_{CaT} n'a pas encore été enregistré. Cependant, il a été montré une expression positive d'ARNm codant pour les sous-unités α1G (Monteil et al., 2000) et α1H (Cribbs et al., 1998), ainsi qu'une nette diminution de α1H au cours du développement du cœur (Qu et al., 2001). Le rôle de I_{CaT} dans la physiologie et la physiopathologie cardiaque reste à élucider. Cette étude vise à mieux comprendre le rôle de I_{CaT} dans l'adaptation et la réponse du muscle cardiaque post-infarctus du myocarde (IDM). De plus, cette étude cherche à établir le rôle de ce canal au cours du remodelage ionique post-IDM, surtout lors de la survenue de troubles du rythme sévères telle la tachycardie ventriculaire.

Le cinquième approche a consisté en l'étude du remodelage cardiaque dans un contexte d'altération de la voie de signalisation intra- et intercellulaire (invalidation spécifique cardiaque du gène codant pour l'expression de la protéine kinase ILK- Integrin linked kinase). Cette étude a été consacrée à l'identification du rôle de la protéine « integrin-linked kinase (ILK) » dans les processus arythmogènes, ainsi qu'à la détermination de l'interrelation entre l'intégrité de la voie de mécano-transduction

cellulaire et la survenue de mort subite. En effet, le knock-out d'ILK dans le tissu cardiaque provoque une dilatation cardiaque favorisant la survenue de mort subite chez les souris âgées de 6 semaines. Les mécanismes impliqués restent à préciser.

Ces travaux de thèse ont permis d'améliorer notre connaissance du rôle des anomalies génétiques impliquant des canaux ioniques et du remodelage ionique dans la physiopathologie des troubles du rythme cardiaque et pourraient ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement préventif du remodelage cardiaque ainsi que dans la lutte contre la mort subite.

CHAPITRE 2 :

MÉTHODES

Chapitre 2 : METHODES

2.1 Modèles animaux

Nos études ont été réalisées avec des souris adultes mâles de différents fonds génétiques : CD1 pour les projets sur l'hypertrophie consécutive à un bloc auriculo-ventriculaire et la création d'un pacemaker biologique par transfert de gène, SV129/C57BL6 pour le projet sur la souris invalidée pour Cav1.3 (Cav3.1-/-) et FVB pour le projet sur la souris invalidée pour ILK (KO-ILK).

Création de l'infarctus du myocarde

Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane 2.5% par intubation trachéale puis ventilation mécanique (à 140 ml/min pour une souris de 30g ; volume tidal, 200 µl ; Minivent Type 845, Hugo Sachs Electronik, Germany). La température du corps des souris est maintenue en permanence à 37°C (rétrocontrôle par une sonde rectale reliée à un appareil thermostat ; Harvard Apparatus, USA).

L'infarctus du myocarde est obtenu par ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante (LAD). Les modèles murins d'infarctus du myocarde ont été décrits en 1978 par Zolotareva et al. Après induction de l'anesthésie générale avec l'isoflurane 2.5%, une injection intrapéritonéale d'analgésique morphinique (buprénorphine-Temgesic, 500 IU/kg) est réalisée. Celle-ci est répétée toutes les 6 à 8 heures après l'opération pendant 2 jours. Une thoracotomie est réalisée dans le quatrième espace intercostal, le péricarde disséqué, l'auricule gauche est soulevé et un fil 9-0 ou 10-0 est placé après l'origine de l'artère coronaire. Pour un résultat optimal, la suture doit entrer exactement à la partie inférieure de l'auricule gauche et ressortir 2 mm plus haut, 1 mm à côté de la chambre d'éjection du ventricule droit. Si l'occlusion de l'artère coronaire est complète, la couleur pâle jaunâtre et l'hypokinésie de la paroi de la région ventriculaire gauche située en aval de la ligature confirment la présence d'un infarctus. Le thorax est alors fermé, la peau suturée et le pneumothorax évacué. La taille de l'infarctus est évaluée par échocardiographie et confirmée à l'examen anatomopathologique. L'occlusion totale entraine un infarctus massif de la paroi libre du ventricule gauche (Ducharme et al., 2000; Trueblood et al., 2001). La mortalité est inférieure à 30%

(Lutgens et al., 1999). Elle prédomine à la phase aiguë postopératoire. Il est important de veiller au maintien de la température corporelle à 37°C pendant tout le protocole.

2.2 Enregistrement d'ECG de surface

Les souris sont anesthésiées grâce à une injection intrapéritonéale (IP) d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate 2mg/ml, Jansen-Cilag S.A.). Les animaux sont ensuite 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 25G 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). Toutes les mesures sont moyennées sur 10 complexes PQRST consécutifs en dérivation D1. Les paramètres mesurés en milliseconde (ms) sont les durées de l'onde P, de l'intervalle PQ, du complexe QRS, de l'intervalle QT et de l'intervalle RR. 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. L'intervalle QT est mesuré du début du complexe QRS à la fin de l'onde T (figure 27). La durée de l'intervalle QT est corrigée en fonction du rythme sinusal par la formule $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$ (Mitchell et al., 1998).

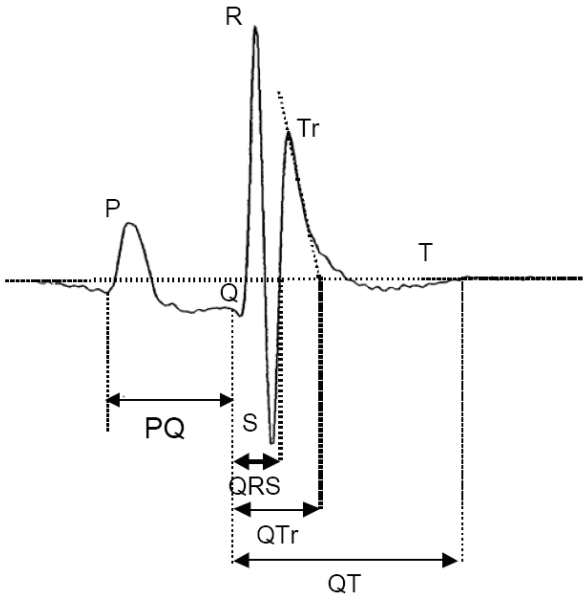

Figure 27: *Electrocardiogramme de surface D1 de la souris.*

2.3 Enregistrement et stimulation endocavitaire chez la souris

Chez la souris, l'étude électrophysiologique (EEP) *in vivo* a été fréquemment utilisée pour évaluer la vulnérabilité aux arythmies ainsi que le phénotype électrophysiologique des différentes lignées de souris transgéniques en recherche rythmologique (Berul et al., 1996-1997-2001). Les 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 des tachycardies. Lors de l'EEP, plusieurs modèles transgéniques murins ont montré un taux élevé de tachycardies par rapport aux souris sauvages (Berul et al., 1997 ; Korte et al., 2002).

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.

- Le temps de récupération sinusale corrigé (TRS), le temps de conduction sino-auriculaire (TECASA) et les effets des interventions physiologiques et pharmacologiques.

L'utilisation du même mode de stimulation au niveau ventriculaire permet d'étudier la conduction nodale rétrograde et de déterminer les périodes réfractaires ventriculaires.

Protocole expérimental

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) d'étomidate à une dose de 25 mg/kg ou par Isoflurane 2.5%. Un ECG de surface D1 est enregistré pendant 3 minutes à l'aide de deux électrodes sous-cutanées de calibre 25 Gauge.

Une analgésie est ensuite réalisée par injection sous cutanée de Nubain 3 µg/kg. Si nécessaire, une dose d'étomidate est ajoutée (10 mg/kg, voie IP).

Une anesthésie locale par injection de xylocaine 1% (dose 40mg/kg) sous-cutanée est réalisée à la droite du cou, et la veine jugulaire droite isolée comme le montre la figure ci-dessous.

Une sonde octapolaire 2F avec un espacement inter-électrodes de 0.5 mm (Cordis Webster®, USA – pour l'ablation du faisceau de His, modèle de BAVc chez la souris) ou une sonde octapolaire 1.2 F (étude d'EEP conventionnelle) est introduite dans le cœur via la veine jugulaire droite.

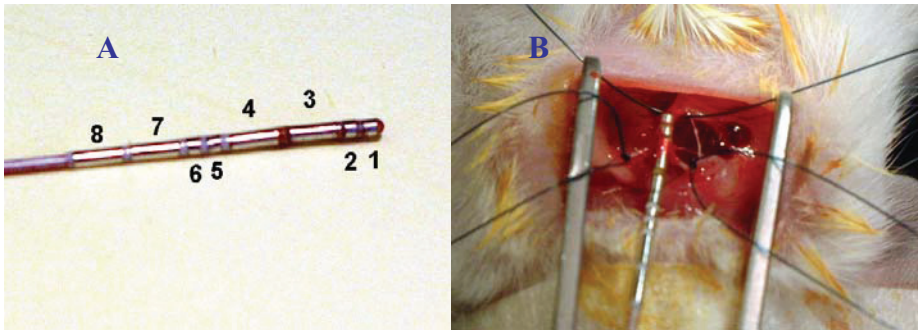

***Figure 28** : A : La sonde octapolaire 2F avec 8 électrodes (4 électrodes de petite surface 1,2,5,6 – utilisées pour la stimulation et 4 électrodes de grande surface 3,4,7,8 - utilisées pour l'ablation*

*par radiofréquence). **B** : L'entrée de la sonde dans la veine jugulaire qui a été fixée par les fils stériles 5.0 non résorbables.*

L'électrocardiogramme de surface (dérivation D1) est enregistré avec deux électrodes sous-cutanées. Ensuite, la sonde d'exploration est positionnée afin d'obtenir l'enregistrement du faisceau de His ainsi que l'électrogramme atrial et ventriculaire. L'ECG de surface D1 et l'électrogramme intracardiaque sont enregistrés sur un ordinateur à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (IOX 1.585, Emka Technologies) pour monitorage et analyse ultérieure avec le logiciel ECG-Auto (Emka Technologies).

La stimulation ventriculaire programmée est réalisée avec un stimulateur UHS 20 Biotronik (Nantes) ou Matlab C++, 509 Stimulator, Grass Telefactor (ICM). Le seuil de stimulation, correspondant à l'énergie minimale entraînant une dépolarisation ventriculaire, est déterminé et les stimulations sont ensuite effectuées à une intensité une fois et demi supérieure à ce seuil. La durée d'impulsion est réglée à 1 ms puis la période réfractaire ventriculaire effective est déterminée. Les protocoles de stimulation utilisés sont calqués sur les protocoles validés en pratique clinique humaine, adaptés aux fréquences cardiaques des souris. On applique d'abord un train de 9 stimuli à 100 ms de couplage suivis de 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. Chaque stade est répété deux fois pour s'assurer de sa reproductibilité.

2.4 Injection intracardiaque

2.4.1 Formulation des plasmides

Tous les plasmides utilisés ont la séquence promotrice du cytomégalovirus (CMV) : le plasmide pcIK-CAT, contenant le gène codant la chloramphénicol acétyle transférase (CAT), et les plasmides pcDNA3-mHnc2 et pcDNA3-Adrb2, contenant respectivement les séquences codantes des gènes murins du canal pacemaker Hcn2 et du récepteur β2-adrénergique (Adrb2). Le plasmide pcDNA3 ne contenant aucune cassette d'expression est utilisé pour les souris sham.

La formulation de l'ADN plasmidique avec le tétronic 304, une poloxamine fournie par BASF (Mount Olive, NJ), est préparée sous forme d'un mélange

équivolumique de tétronic 304 (10% dans de l'eau) et d'ADN plasmidique (25% de plasmide pcDNA3-Adrb2 et 75% de plasmide pcDNA3-mHcn2) dans du Tyrode.

2.4.2 Manipulation des souris

2.4.2.1 Injection des transgènes

Les souris mâles adultes sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/kg ; Imalgène 500®, Mérial, France) et de xylazine (20 mg/kg; Rompun 2%, Bayer Pharma, France). Une analgésie est obtenue par injection sous-cutanée de 1 mg/kg de nalbuphine (Nubain ®, CERB, France). Les souris sont ventilées à 140 cycles/min à l'aide d'un ventilateur (Minivent Type 845, Hugo Sachs Electronik). La température corporelle est maintenue à 37^{o}C avec un tapis chauffant. Après la thoracotomie gauche dans le cinquième espace intercostal, chaque souris reçoit une injection de 10 µL de solution d'ADN-tétronic 304 avec une seringue Hamilton (aiguille de 30 gauges) dans la paroi du ventricule gauche.

2.4.2.2 Suivi à long terme

Le principal avantage du transfert de gène de l'origine du pacemaker biologique dans notre modèle est qu'il est aisé de suivre son fonctionnement par un simple ECG de surface à des dates définies.

2.4.2.3 Evaluation du gène rapporteur

Deux, 3, 5 et 8 jours après injection du plasmide pCIK-CAT (31 µg/10 µl), les cœurs des souris sont disséqués, congelés dans l'azote liquide et homogénéisés dans 1 ml de tampon de lyse (Proméga, Charbonnière, France), supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (Proméga). Après centrifugation à 10000 tours/min pendant 5 minutes, l'activité de la CAT est mesurée à partir d'un aliquot de surnageant grâce au lecteur de plaques à marqueurs multiples VICTORS2 (PerkinElmer, Les Ulis, France), en utilisant un kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Promega, Madison, WI, USA). Chaque échantillon de cœur est analysé en duplicat. L'activité de la CAT, c'est-à-dire son niveau d'expression, est déterminée dans 200 µl de surnageant, en accord avec les instructions du fournisseur.

2.4.2.4 Immunohistochimie

Juste après l'euthanasie des souris, les cœurs sont prélevés, rincés dans du PBS, et séchés. Le cœur est ensuite fixé dans du Tissue-Tek® (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), plongé dans de l'isopentane refroidi au contact de l'azote liquide. L'organe est ensuite coupé au cryostat en fines sections de 8 µm récupérées sur des lames de verre. Les coupes sont finalement fixées par un bain d'acétone pendant 10 min, puis stockées à -80^{o}C pendant 12h.

Pour les expériences d'immunomarquage, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps anti-GFP polyclonal (rabbit) (Chemicon, CA, USA). Cet anticorps est ensuite couplé à l'anticorps anti-rabbit IgG-Biotinylé (Sigma, St Louis, MO, USA), puis à la Streptavidine-HRP (Dako Cytomacion, Denmark).

2.5 Ablation du faisceau de His par radiofréquence

2.5.1 Principe de l'ablation par radiofréquence :

Les effets physiologiques des courants de radiofréquence ont été décrits pour la première fois par Darsonval en 1893. Celui–ci avait observé que ce type de courant pouvait traverser le corps humain sans entraîner d'autres effets qu'un échauffement au point de contact entre les fils conducteurs et la peau.

Les travaux expérimentaux initiaux visant à évaluer l'utilisation des courants de radiofréquence pour l'ablation endocavitaire ont été effectués au milieu des années 80, et la première application clinique a été réalisée en 1986 pour l'ablation de la jonction auriculo-ventriculaire (Lavergne et al., 1986).

Les courants de radiofréquence sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence varie entre 300 kHz et 3 MHz. Il s'agit d'ondes de courant et de tension de forme sinusoïdale qui peuvent être délivrés sous forme de trains continus (mode continu) ou intermittents (mode pulsé). Ils agissent principalement par effet thermique. Cette énergie est véhiculée au niveau du cœur par l'intermédiaire d'électrodes.

Les effets biologiques des courants de radiofréquence résultent de l'échauffement des structures biologiques. Pour une température comprise entre 46 et 99°C on obtient à la phase aiguë des lésions homogènes, de forme ovoïde, avec une zone centrale de nécrose de coagulation entourée d'un infiltrat hémorragique (Huang, 1987).

Secondairement, ces lésions aboutissent à une cicatrice fibreuse, homogène et bien délimitée avec néanmoins parfois quelques expansions spéculaires dans le myocarde avoisinant (Lavergne et al., 1989).

2.5.2 Protocole expérimental

Le signal du potentiel du faisceau de His recueilli doit être stable et net (le mieux volté possible) sur l'enregistrement endocavitaire en déplaçant le cathéter. La validation du potentiel du faisceau de His est un moment essentiel, assez difficile, qui conditionne le résultat et la sécurité d'une ablation.

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 28). Avant ablation, il est nécessaire de vérifier encore une fois l'état général de la souris, l'état d'anesthésie, le seuil de stimulation ventriculaire droite avant l'application des courants de radiofréquence.

Si le premier tir est efficace, le rythme sinusal est supprimé, le ventricule bat en rythme d'échappement idioventriculaire : nous obtenons ainsi une souris en BAVc. Si elle est encore en rythme sinusal après le premier tir, nous pouvons tenter d'autres tirs après une pause de 5 minutes (5 tirs au maximum pour chaque souris).

Après ablation, la souris est stimulée au niveau ventriculaire à un rythme d'environ 240 bpm (RR = 250 ms) pendant 5 minutes. A l'issue de cette période, la valeur du RR d'échappement spontané et la PREV2 sont déterminées. Ensuite, la souris est stimulée en continu au rythme de 240 bpm, puis injectée avec une dose 200 ng/g d'isoprénaline par voie IP. Après 3 minutes d'attente, le stimulateur est arrêté pour obtenir la réponse chronotropique en rythme d'échappement spontané et la répétition de la mesure de PREV3. A la fin de la procédure, la sonde est retirée, la souris recousue et mise sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie jusqu'au réveil.

Le sacrifice des souris est effectué par une dislocation cervicale. Le cœur est prélevé, pesé puis coupé en 5 parties : les 2 oreillettes, la paroi libre du ventricule droit, la paroi libre du ventricule gauche, le septum interventriculaire et l'apex. Tous ces parties sont congelées et conservées à –80°C pour la RT-PCR quantitative.

Des ablations ont été réalisées sur des souris préalablement implantées avec un capteur de télémétrie (TA10EA-F20, Data Sciences International). Pour l'implantation des capteurs, une anesthésie générale (étomidate 25 mg/kg IP) puis une anesthésie locale (lidocaïne 1%, 50 µl) au niveau du flanc de l'animal ont été réalisées. Les deux électrodes étaient placées en sous-cutanée et suturées au plan musculaire sur le thorax de façon à obtenir une dérivation DII. Le capteur de télémétrie était inséré dans une poche sous-cutanée au niveau du flanc. Les souris ont été hébergées dans des cages individuelles dans une animalerie à température contrôlée avec des cycles jour/nuit de 12 h.

Les données récoltées en télémétrie nous permettent de mesurer la durée de l'intervalle RR moyen sur 24 h, 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 SA. L'enregistrement continu nous permet par ailleurs d'évaluer les variations nycthémérales de la fréquence cardiaque.

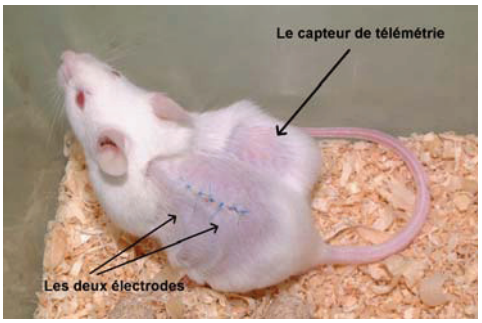

Figure 29 : *Une souris en BAVc implantée avec un capteur de télémétrie.*

Après ablation, les signaux ECG des souris implantées étaient enregistrés en continu 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).

2.6 Echocardiographie

Avant de démarrer l'examen, à l'aide d'une crème épilatoire, la souris est épilée au niveau de la paroi antérieure du thorax. On applique ensuite du gel préchauffé sur le thorax. La souris est gardée au chaud, à l'aide d'une plaque électrique, en position

couchée sur le dos avec une inclinaison légère (décubitus gauche) et scopée (ECG). Des images sont alors enregistrées en parasternal grand axe et parasternal petit axe (2D et TM) par une sonde i13L (10 ~ 14 Megahertz) et un échographe Vivid 7 Dimension (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). À partir de l'image échocardiographique en parasternal grand axe, le curseur du mode M est placé perpendiculairement au septum interventriculaire (IVS) et à la paroi ventriculaire gauche postérieure (PP) pour mesurer les diamètres du ventricule gauche et les épaisseurs du septum et de la paroi postérieure en systole et en diastole. À partir des données obtenues en TM parasternal grand axe, on détermine la fonction systolique du ventricule gauche (VG), sa masse et sa taille. L'analyse de la fonction diastolique est difficile car, d'une part, la fréquence cardiaque de la souris est très élevée et, d'autre part, il est difficile d'obtenir des images en apical pour un bon alignement du tir doppler au niveau de l'entonnoir mitral. La fraction de raccourcissement (FR) est calculée à partir des mesures obtenues en M mode selon l'équation : FR (%) = [(DTDVG – DTSVG)/DTDVG)] × 100 (DTDVG : diamètre télédiastolique du VG ; DTSVG : diamètre télésystolique du VG). La fraction d'éjection (FE) est calculée à partir du petit axe selon l'équation : FE (%) = [(LVDS – LVSS)/(LVDS)] × 100 (LVDS : surface du VG en diastole ; LVSS : surface du VG en systole). La méthode de Teicholz est utilisée pour calculer le volume du VG et la fraction d'éjection. La moyenne de 3 cycles cardiaques consécutifs est utilisée pour la mesure des valeurs.

2.7 Mesure de la courbe Pression-volume du ventricule gauche

L'artère carotide droite est libérée du plan musculaire profond, séparée de son adhérence avec le nerf vague, puis ligaturée en sa partie proximale. Elle est alors clampée en partie distale afin d'y introduire un cathéter pression-volume 1.2F (Scisense Inc, Canada). La pression artérielle est enregistrée durant une minute dans l'artère carotide après une minute de stabilisation, puis la sonde est descendue par voie rétrograde dans le VG, jusqu'en position de butée à l'apex de celui-ci. Les données sont enregistrées et analysées sur le logiciel Emka IOX 1.8.9.4. La correction de la conductance est faite par une injection de 5 µl de NaCl 20% dans la veine jugulaire gauche.

2.8 Rétro-transcription,-PCR et PCR quantitative

La rétro-transcription permettant la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire a été effectuée à l'aide d'une ADN polymérase ARN-dépendante (Multiscribe^{TM} Reverse Transcriptase ; Applied Biosystems) à 37°C pendant 2 heures après une incubation à 15°C pendant 10 minutes.

La quantification par PCR de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de la technologie TaqMan® : au début de la PCR, une sonde Taqman, qui correspond à un oligonucléotide complémentaire de la région centrale du réplicon se fixe sur le réplicon. Cette sonde est associée à un fluorophore et à un *quencher* dont la présence à proximité du fluorophore annihile la fluorescence. Lors de la PCR, au cours de la phase de réplication, l'ADN polymérase, ou plutôt la Taq DNA polymérase dont la particularité est d'avoir une activité exonucléasique 5'-3', clive la sonde Taqman par son extrémité 5', séparant ainsi le fluorophore du *quencher* et libérant une fluorescence. La fluorescence augmente alors à chaque cycle de PCR. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produits de PCR synthétisés. Les réactions de PCR quantitative sont réalisées avec Taqman Gene Expression Master Mix kit (Applied Biosystems) et en utilisant le protocole de cette compagnie. Les réactions sont effectuées avec un appareil Stratagene MX3000. Les values relatives de l'expression des gènes sont calculées par la méthode de $\Delta\Delta$Ct (Livak et al., 2001).

2.9 Isolement des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont obtenus à partir du ventricule gauche des souris en utilisant la méthode de perfusion rétrograde des enzymes (Trépanier-Boulay et al., 2001). Les souris sont heparinées (5000 UI/kg, IP) puis anesthésiées avec du pentobarbital de sodium (50 mg/kg, IP) ou de l'isoflurane 2.5%. Après la dislocation cervicale, le cœur est prélevé et perfusé de manière rétrograde par canulation de l'aorte en Langendorff pendant 3 min (2 ml/min). La solution de Tyrode perfusée à 37^{o}C 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. Toutes les solutions sont réalisées avec de l'eau déionisée et oxygénée pendant 20 minutes (100% d'oxygène). Brièvement, juste après le prélèvement, le cœur est perfusé pendant 5 minutes avec la solution de Tyrode contenant 1 mM de $CaCl_2$, puis

pendant 6 minutes avec la solution de Tyrode sans $CaCl_2$, et enfin pendant 20 à 25 minutes avec 45 ml de Tyrode sans $CaCl_2$ dans laquelle sont ajoutés les composés suivants : Collagénase de type 2 (Worthington) 73.71 U/ml, Taurine 20 mM, BSA (Bovin Serum Albumin) 0.1% et $CaCl_2$ 30 µM. A la fin de perfusion, les ventricules sont coupés à la base de l'aorte et placés dans une boite de pétri contenant une solution de KB. Ils sont coupés en petits morceaux et triturés au ciseau puis à la pipette dont l'ouverture a été agrandie pour dissocier les cellules. Les cellules sont gardées à 4°C dans la solution de KB jusqu'à utilisation.

2.10 Analyse électrophysiologique

La technique de patch-clamp est utilisée pour enregistrer les courants calciques avec le mode de voltage-clamp en configuration "cellule entière". Les électrodes en Borosilicate (Sutter Instrument) sont remplies avec une solution intrapipette puis connectées à un système d'amplification (Axopatch 200A, Axon). Les électrodes ont une résistance de 2 à 5 MΩ. Les courants sont exprimés en densité (pA/pF). Tous les enregistrements sont réalisés à 37°C. La solution extracellulaire pour la mesure d'I_{CaL} comprend (mmol/L) : tetraethylammonium chloride 136, CsCl 5.4, $MgCl_2$ 0.8, $CaCl_2$ 2, NaH_2PO_4 0.33, dextrose 10, et HEPES 10, pH 7.4(CsOH). L'acide niflumique (50 µmol/L) est ajouté pour inhiber le courant Cl^- Ca^{2+}-dépendant, et la 4-aminopyridine (2 mmol/L) est ajoutée pour supprimer I_{to}. La solution intrapipette pour la mesure d'I_{CaL} comprend (mmol/L) CsCl 120, tetraethylammonium chloride 20, $MgCl_2$ 1, EGTA 20, ATP-Mg 5, HEPES 10, et GTP (lithium salt) 0.1, pH 7.4 (CsOH).

2.11 Enregistrement du PA et mesure de la vitesse de conduction

Le cœur de souris perfusé de façon rétrograde par voie aortique à 35°C est placé sur le plancher d'une chambre de tissus Lucite de 30 ml (figure 30). La solution de perfusion aortique de type Krebs-Henseleit contient en mmol/l : NaCl 120, KCl 4, MgSO4 1.2, KH2PO4 1.2, NaHCO3 25, CaCl2 1.25, dextrose 1g/L; 95% O2/5% CO2, pH 7.4. Des microélectrodes flottantes avec des résistances de pointe de 15 à 20 MΩ sont utilisées pour enregistrer les PA des cellules ventriculaires. Une stimulation par salves de 10 impulsions (intensité de 1.5 fois la valeur du seuil de stimulation) à une

durée de cycle de 150 ms est délivrée avec un stimulateur électronique. La phase 0 ascendante du PA est analysée par différenciation électronique. Le temps d'activation a été défini comme le temps de dV/dtmax.

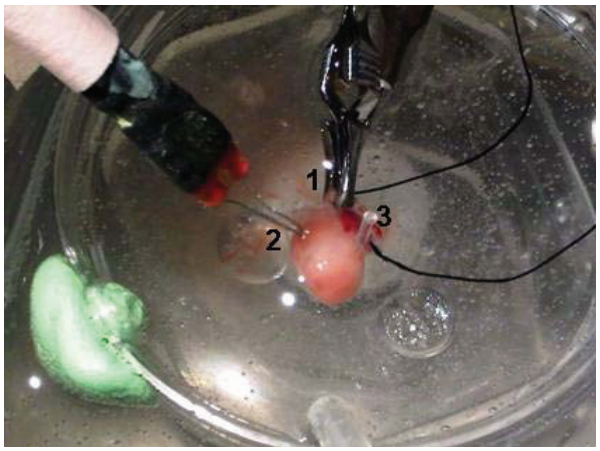

Figure 30 : *Illustration de la procédure d'enregistrement du PA sur le ventricule gauche d'un cœur de la souris KO-ILK (1 : fixation et perfusion aortique, 2 : électrodes de stimulation, 3 : microélectrode flottante pour enregistrer les PA).*

2.12 Extraction des protéines

L'extraction des protéines membranaires à partir de tissu auriculaire ou ventriculaire de souris a été réalisée de la façon suivante. Les tissus fraichement prélevés ont été réduits en poudre à l'aide d'un mortier après avoir été préalablement congelés dans de l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue a ensuite été homogénéisée à l'aide d'un polytron dans un tampon d'extraction contenant en mmol/L : Tris 25, EDTA 5, EGTA 5, NaCl 150, NaF 20, Na_3VO_4 0.2, β-glycerophosphate 20, PMSF 0.5; leupeptin 25 µg/mL, aprotinin 10 µg/mL, pepstatin 1 µg/mL, microcystin-LR 1 µM, pH 7.34, HCl. Une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C a ensuite été réalisée afin d'éliminer les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant ainsi collecté, correspondant aux protéines cytosoliques et membranaires, est centrifugé a 48000 rpm pendant 1 heure à 4°C. L'objectif de cette étape est de favoriser la séparation entre les protéines membranaires et les protéines cytosoliques. Le principe est simple, les protéines cytosoliques, solubles dans le tampon d'extraction, se retrouvent dans le surnageant et les protéines membranaires, entourées de lipides, sont entrainées vers le culot. Il est

important de noter qu'à cette étape, le tampon d'extraction utilisé ne doit pas contenir de détergeant qui pourrait éliminer les lipides autour des protéines membranaires et ainsi entrainer l'échec de la séparation. Le surnageant obtenu après ultracentrifugation est collecté. Le culot, enrichi en protéines membranaires, est resuspendu dans un tampon d'extraction identique à celui décrit ci-dessus mais auquel est ajouté 1% de Triton-X-100. Le Triton-X-100 est laissé agir pendant 30 minutes sur la glace, l'objectif étant de libérer les protéines extraites de toute trace de lipide les entourant, favorisant ainsi l'exposition de leurs épitopes pour les anticorps. Une centrifugation rapide à 3000 rpm pendant 5 minutes à 4^{o}c permet d'éliminer les possibles débris résiduels non solubilisés après le traitement. Un dosage de protéines par la technique de Bradford a ensuite été réalisé sur chacun des échantillons de protéines membranaires obtenus, l'objectif étant de déterminer de façon précise la concentration de protéine pour chacun des échantillons. Une quantité de 20 à 50 µg de protéines (dépendamment de la protéine étudiée) a ensuite été déposée sur un gel de polyacrylamide-SDS pour l'analyse par western-blot.

2.13 Western-blot

Le principe du SDS-PAGE ou western-blot consiste à séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une révélation immunologique permet d'identifier les protéines d'intérêt. Tout d'abord, les protéines sont mises en présence de SDS. Le SDS est un composé chargé très négativement qui se complexe avec les protéines et les linéarise. La charge des protéines devient négligeable par rapport à celle du SDS. Ensuite, les protéines sont déposées dans un gel de polyacrylamide. Ce gel de polyacrylamide est comparable à un immense filet dont la taille des mailles dépend de la concentration en polyacrylamide : plus sa concentration est élevée, et plus les mailles du gel seront petites. Ainsi, lorsqu'un champ électrique est appliqué sur le gel, les protéines migreront toutes de façon identique suivant leur charge (à cause du SDS), seule la taille des protéines conditionnera leur vitesse de migration car une grosse protéine aura plus de difficulté à traverser les mailles du gel, qu'une petite protéine. C'est la raison pour laquelle les protéines de faible poids moléculaire sont retrouvées au bas du gel, alors que les protéines de haut poids moléculaire sont localisées en haut du gel. Afin de discriminer les protéines de bas poids moléculaire, il est préférable de couler un gel à forte concentration

de polyacrylamide, alors qu'il sera préférable d'utiliser un gel de faible concentration en polyacrylamide pour discriminer des protéines de petits poids moléculaire.

Dans nos conditions, nous avons choisi de travailler avec des gels de 7-10% de ployacrylamide le plus souvent dépendamment du poids moléculaire des protéines étudiées. Après séparation dans le gel, les protéines sont transférées et exposées sur membrane de PVDF ou de nitrocellulose. La membrane est bloquée à l'aide d'une solution riche en lait (caséine), procédure qui permet de limiter une hybridation non spécifique des protéines sur la membrane. La révélation des protéines d'intérêts est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, puis, un anticorps secondaire vient se fixer spécifiquement sur l'anticorps primaire. Cet anticorps primaire est couplé à une peroxydase qui permet de catalyser la réaction suivante à l'endroit même ou est localisée la protéine. L'application d'un film photographique permet de localiser la bande correspondant à la protéine d'intérêt et de corréler son niveau d'expression à l'intensité du signal obtenu. Il est à noter que l'intensité du signal obtenu pour une protéine d'intérêt est toujours normalisée par rapport au signal obtenu pour une protéine de référence dont l'expression n'est pas modifiée dans la condition testée. Dans nos études nous avons choisi d'utiliser comme référence la protéine Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

2.14 Analyse histologique - quantification de la fibrose

Le tissu cardiaque a été fixé dans du formol tamponné, inclus en paraffine, puis sectionné. Les sections avec le ventricule droit, le ventricule gauche et le septum visibles ont été sélectionnées, apposées sur des lames et colorées avec du trichrome de Masson, un colorant largement utilisé pour le marquage de la fibrose qui colore les cardiomyocytes en rouge, la fibrose en bleu, et les zones inflammatoires en pourpre. Des images de l'ensemble du tissu ont été prises en lumière blanche avec un microscope équipé d'une camera. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide du logiciel ImagePro, les paramètres de base étant fixes (objectif: 20X, intensité lumineuse: 4.0). Deux palettes de couleur ont ensuite été créés en sélectionnant les pixels avec la couleur d'intérêt: pour la fibrose, et pour la superficie totale. Pour chacune des images, la palette de couleur établie pour la fibrose a été chargée, permettant ainsi la sélection des zones

fibrotiques et la quantification de leur surface (mm^2). La même procédure a été répétée en chargeant la palette de couleur établie pour la sélection de la surface totale du tissu (mm^2). Le rapport entre la surface de la zone de fibrose et la surface totale de tissu a permis de déterminer le pourcentage de fibrose pour chacun des tissus observés. L'ensemble des rapports ont ensuite été compilés pour chacun des compartiments cardiaques, le ventricule droit, le septum, et le ventricule gauche, respectivement, chez toutes les souris testées. Ceci nous a permis d'évaluer le pourcentage global de fibrose dans chacun des compartiments pour un génotype donné. Le pourcentage de fibrose a été comparé entre les compartiments d'un même génotype, et entre les compartiments de différents génotypes. L'absence ou la présence de processus inflammatoires a été évaluée directement par observation pour chacune des images.

2.15 Immuno-marquages

Les cœurs de 5 souris WXK et de 5 souris KO-ILK ont été prélevés et congelés rapidement dans de l'azote liquide. Des cryo-coupes de 14 microns d'épaisseur ont ensuite été réalisées et apposées sur des lames chargées positivement permettant une meilleure adhésion de la coupe. Les coupes ont été fixées dans une solution de PBS 1X contenant 4% de paraformaldehyde (pH 7.3). Après 3 rinçages en PBS 1X, les coupes ont été bloquées et perméabilisées dans une solution de PBS 1X contenant 2% de sérum normal d'âne et 0.5% de Triton X-100. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est ensuite appliqué sur les tissus pendant 12 h à 4^oC après dilution au $1/200^{ème}$ dans une solution de PBS 1X contenant 1% de sérum normal d'âne et 0.2% de Triton X-100. Apres trois lavages successifs en PBS 1X, les anticorps secondaires conjugués à des molécules fluorescentes (Alexa-fluor) sont appliqués (1/600) sur les tissus pendant 1 h à la température de la pièce. Après 3 rinçages, les lames sont montées avec un milieu composé de DABCO et de glycérol. Le marquage est enfin observé à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM7 live. Les images sont réalisées avec un objectif à huile 25x plan apochromate. Les acquisitions sont faites en mode « tile » ce qui nous permet de visualiser le marquage sur l'ensemble du cœur de souris. Des « z-stack » sont réalisés chaque micron afin de faire les acquisitions sur l'entière épaisseur du tissu. Les images

sont déconvoluées à l'aide d'un algorithme « maximum likelyhood estimation » puis l'analyse d'intensité est effectuée avec le logiciel Zen de Carl Zeiss.

2.16 Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous la forme de moyenne ± écart-type de la moyenne. Un test de Fischer a été utilisé pour comparer la proportion de troubles du rythme dans chaque groupe. Une analyse de variance, couplée à un test de Bonferroni pour comparaisons multiples, ont été utilisés pour la comparaison des différents paramètres. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la probabilité d'erreur p était inférieure à 0.05.

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS

I. Remodelage moléculaire précoce et tachycardie ventriculaire spontanée dans un modèle murin de bloc auriculo-ventriculaire complet.

Le bloc AV complet (BAVc) est une dissociation totale entre l'activité auriculaire et l'activité ventriculaire. En effet, toutes les ondes P sont bloquées, les complexes QRS sont sous la dépendance d'un foyer de substitution prenant origine au-dessous de la zone de bloc, et dont la fréquence est en principe d'autant plus lente qu'il est situé plus bas. Les ondes P sont sinusales et ont un rythme compris entre 70 et 80 bpm, alors que les ventricules sont généralement commandés par un rythme lent infranodal ou idio-ventriculaire aux alentours de 30 à 40 bpm. L'implantation définitive d'un stimulateur cardiaque est recommandée chez ces patients.

Le BAVc congénital a d'abord été reconnu en 1901 par Morquio en utilisant l'auscultation et l'électrocardiographie. Les BAVc congénitaux sont isolés ou associés à des malformations anatomiques cardiaques. En raison de la rareté et de l'étiologie complexe du BAVc, son incidence réelle n'est pas bien établie et est évaluée à environ 1/11000 naissances (Buyon et al., 1998). L'association entre le BAVc congénital et la maladie du tissu conjonctif de la mère a été décrite par Chameides et al., 1977. Dans ce dernier cas, le sérum contenant les anticorps maternels contre la SSA/Ro et la SSB/La, ribonucléoprotéines IgG positives, inhibe les courants I_{CaL} et I_{CaT} (les courants Na^+ et K^+ ne sont pas été affectés) dans les myocytes cardiaques isolés et induit la bradycardie sinusale dans un modèle murin de BAVc. Le mécanisme d'interaction entre IgG et l'inhibition des deux types de courants Ca^{2+} reste à élucider (Xiao et al., 2001).

Comme les syndromes du QT long, les bradycardies par BAVc avec un rythme d'échappement de fréquence lente représentent l'étiologie la plus fréquente des Torsades de pointe (TdP). Il s'agit de tachycardies ventriculaires (TV) dont la morphologie des complexes QRS varie progressivement, réalisant une véritable torsion autour de la ligne isoélectrique avec polarité inversée de façon cyclique. Cette forme de TV peut se transformer en fibrillation ventriculaire irréversible, une des causes majeures de la mort subite.

Le QT long et les TdP induits par l'utilisation de médicaments est un phénomène rare, mais pouvant engager le pronostic vital, qui est observé avec certaines classes de médicaments. Ce phénomène a conduit au retrait du marché de médicaments auparavant très largement prescrits (Haverkamp et al., 2000). Il est plus fréquemment observé avec les antiarythmiques de classe III. Par conséquent, afin d'améliorer les médicaments anti-arythmiques et d'évaluer l'incidence du développement des TdP et des effets indésirables proarythmiques (la FA, la TV…) des autres classes de médicaments en développement, des études de pharmacologie de sécurité cardiaque ont été mises en place. Dans ce cadre, de nombreux modèles animaux de BAVc ont été créés : le chien (Oros et al., 2008), la chèvre (Neuberger et al., 2006), le porc (Schmidt et al., 2009), le lapin (Farkas et al., 2002), le cobaye (Hashimoto, 2008) et le rat (Yokokawa et al., 2008).

En utilisant une méthode d'ablation du nœud AV par radiofréquence, nous avons créé pour la première fois un modèle de BAVc chez la souris. Ce modèle nous a permis d'étudier le processus de remodelage électrique lors de la survenue des TdP dans la phase aigue post-BAVc. Cet article est actuellement soumis à publication.

Article 1 : **Early molecular remodeling and spontaneous ventricular tachycardia in a mouse model of complete atrioventricular block**

Early molecular remodeling and spontaneous ventricular tachycardia in a mouse model of complete atrioventricular block

Olivier BIGNOLAIS[1-3*], Patrice NAUD[1-3*], Khai LE QUANG[1-3*], Aziza EL HARCHI[1,3], François Briec[1-3], Julien PIRON[1,3], Anne-Laure LEONI[1,3], Denis ESCANDE[1,3,4,†], Sophie DEMOLOMBE[1-3], Flavien CHARPENTIER[1-4]

[1] INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

[2] CNRS, ERL3147, Nantes, F-44000 France

[3] Université de Nantes, Nantes, F-44000 France

[4] CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

* These authors contributed equally to the present work

[†] Deceased

Running title: ionic remodeling and arrhythmias in AV block

Address for correspondence:

Flavien CHARPENTIER

INSERM UMR915, CNRS ERL3147

l'institut du thorax

IRT-UN, 8 quai Moncousu

BP 70721

44007 Nantes cedex 1, France

Abstract

Complete atrioventricular block (CAVB) and related ventricular bradycardia are known to induce ventricular hypertrophy and arrhythmias. We investigated ion channel remodeling and its functional consequences in relation to time after CAVB in a mouse model of radiofrequency-mediated His bundle ablation. Using high-throughput real-time RT-PCR, left ventricular expression of 96 genes encoding ion channel subunits, transcription factors and contractile proteins was evaluated before and 12 h, 1, 2 and 5 days after CAVB. ECG, left ventricular pressure recordings and patch-clamp were used for the functional characterization. CAVB was associated to a lengthening of the QT interval. Polymorphic ventricular tachycardia was recorded in 6/9 freely-moving mice during the first 24 h post-ablation. Myocardial hypertrophy was evident only at day 2 with increased heart weight and altered expression of contractile proteins (up-regulation of ß-MHC and skeletal α-actin; down-regulation of troponin C and MLC2V). During the first 24 hours (as early as 12 h), genes encoding ion channel subunits were either up-regulated (such as Nav1.5, +55%) or down-regulated (Kv4.2, -41%; KChIP2, -46%; Cnx43, -29%). Altered expression of these genes was either transient (Nav1.5, Kv4.2, Cnx43) or maintained (KChIP2). Expression of 10 other ion channels was altered only at day 2 (KvLQT1, Kir6.2) or 5 (Cav1.2, Kir6.1). Consistent with the transient alteration of Kv4.2, I_{to} was reduced at day 1 and restored to control at day 5. In conclusion, CAVB induces two phases of molecular remodeling: one early phase (<24 h) is related to electrical remodeling and arrhythmias, the second one to the hypertrophy process.

Key words: arrhythmia, bradycardia, gene expression, hypertrophy, ion channels

Introduction

Acute complete atrioventricular block (CAVB) is a well-recognized cause of sudden cardiac death. Disruption of the electrical conduction at the atrioventricular junction leads to a shift of the main pacemaker toward the ventricle, which abruptly paces the heart at a low idioventricular rate. There are at least 3 consequences associated with CAVB and low escape rhythm: i) acquired long QT syndrome and electrical remodeling, leading to a risk of torsade de pointes arrhythmias, syncope and sudden death; (ii) biventricular hypertrophy resulting from volume overload also aggravated by atrioventricular desynchronization; (iii) heart failure as the ultimate consequence of decompensate hypertrophy, especially when CAVB occurs in a diseased heart.

Different animal models of CAVB have been established with the most common being the dog model.[1-9] Dogs tolerate well CAVB and do not exhibit spontaneous arrhythmias but enhanced susceptibility to torsade de pointes when challenged with a QT-prolonging drug.[1,2,3,4] In dogs, electrical remodeling precedes ventricular hypertrophy[5] and encompasses decreased delayed rectifier currents I_{Kr} and I_{Ks}[6] and up-regulated Na/Ca exchanger.[7] Neither the transient outward current I_{to} nor the inward rectifier I_{K1} is affected by electrical remodeling.[6] More recently, a rabbit model has been documented.[8,9] In contrast to dogs, rabbits do not tolerate CAVB and show a high incidence of spontaneous torsades de pointes and sudden death.[8] In rabbits like in dogs, electrical remodeling processes from decreased I_{Kr} and I_{Ks} currents, is dissociated from ventricular hypertrophy and is determined by the magnitude of bradycardia.[9]

In the present study we have developed a novel model of CAVB in the mouse

by interrupting conduction at the AV junction using a radiofrequency-mediated ablation procedure. We thought that the mouse has several advantages over dogs and rabbits. In contrast to the rabbit, the mouse genome has been entirely sequenced thus allowing investigation of molecular remodeling at a genome scale. In addition, various genetically invalidated or overexpressing mouse models with altered ion channel[10] or transcription factor expression are available and may prove their value to dissect further the mechanisms responsible for electrical remodeling and arrhythmias. Finally, the mouse has a high reproduction rate and is most suitable when large numbers of animals are needed such as in time-course experiments. The mouse model has also several disadvantages in comparison with competing models including the small size of the heart (about 100 mg), which is technically challenging, a high cardiac beating rate (about 600 cycles/min) and cardiac electrophysiology characteristics different from those of the human heart.[10] In spite of these differences, mice in CAVB spontaneously exhibited soon (<24 hours) after AV ablation repetitive episodes of polymorphic ventricular tachycardia, strongly resembling torsades de pointes in human. These episodes occurred before molecular markers for hypertrophy were detectable (>48 hours). Torsades de pointes occurred concomitantly with a dramatic rearrangement of cardiac molecular ion channel and transcription factor expression. Our data show that the mouse in CAVB is a powerful model to investigate molecular mechanisms governing the early electrical remodeling that creates an arrhythmogenic substrate in the absence of structural remodeling.

Materials and Methods

After a 2-week acclimatization period, 10-week old male CD1® mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were randomized into 6 groups. One group was a control group. Four other groups of mice underwent ablation of the His bundle and were studied at 12 hours (CAVB H12 group), 1 day (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5) after CAVB induction. The sixth group was composed of mice that underwent the same surgical procedure without ablation (sham group). The number of mice *per* group for each type of experiment will be given in the results section or in the figure legends.

Induction of atrioventricular block.

After anesthesia and analgesia with intraperitoneal (i.p.) injection of etomidate (25 mg/kg; Hypnomidate®, Janssen-Cilag, Belgium) and nalbuphine (3 µg/kg; Nubin®, CERB, France), mice were heparinized (5 units intravenously; Sanofi, France). After local anesthesia with a subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine 1%, Astra-Zeneca, UK), a 2F quadripolar catheter for radiofrequency ablation specially designed by Biosense® (Johnson & Johnson, USA) was introduced into the right atrium and ventricle through the right internal jugular vein. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis and measurements. After detection of the His bundle activity, radiofrequency ablation was performed using a H200S pulse generator (Osypka Hat 200S, Germany). Pulses were 15 sec long at a power of 2-2.5 W.

ECG recording

In conscious mice. Under general anesthesia with etomidate (35 mg/kg i.p.) and local anesthesia with lidocaine, mice were implanted with a telemetric device. A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20; Data Sciences International, USA) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax. Telemetric ECG signals were computer-recorded with a telemetry receiver and an analog-digital conversion data acquisition system for analysis with ECG auto 1.5.11.26 (EMKA Technologies) software. Mice were implanted prior to the His bundle ablation procedure.

In anesthetized mice. Six-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.7). Recordings were filtered between 0.5 and 250 Hz. Mice were anesthetized with etomidate (15 mg/kg i.p.). Body temperature was maintained at 37°C using a thermally controlled heating pad (Harvard Apparatus, USA). Criteria used for measuring RR, PR and QT intervals, as well as P wave duration can be found elsewhere.[11] QT intervals were corrected for heart rate using two different formulas:

1. a modified Bazett formula, $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$, as proposed by Mitchell and co-workers,[12] and
2. a modified Fridericia formula, $QTc = QT/(RR/100)^{1/3}$,

both with QT and RR measured in ms.

Hemodynamics in anesthetized mice

Five days after His bundle ablation, animals were anesthetized with etomidate (35 mg/kg i.p.). Lidocaine was injected at the incision site along the trachea. Body

temperature was maintained at 37°C. The right carotid artery was isolated. A catheter tip pressure transducer (Mikrotip 1.4F, Millar Instruments, USA) was inserted into the right carotid artery and advanced to the left ventricle under guidance of the pressure signal. Blood pressure and left ventricular pressure (LVP), maximal positive (+dP/dt) and maximal negative (-dP/dt) rates of pressure development were recorded after a minimum 10-minute stabilization period using a PowerLab data acquisition system (AD Instruments, USA).

TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Mice were killed by cervical dislocation under general anesthesia with etomidate (30 mg/kg i.p.) and the hearts quickly excised. Left ventricular free wall was carefully dissected and flash-frozen in liquid nitrogen. Total RNA from individual ventricular preparations was isolated and treated with DNase 1 (Sigma, USA). The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA). Lack of genomic DNA-contamination was verified by PCR.

TaqMan low-density arrays (Applied Biosystems, USA) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.[13] Briefly first-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then performed on TaqMan low-density arrays using the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. The genes selected for their cardiac expression (listed in the supplementary Table 1) encode 62 ion channel α- and auxiliary subunits, 6 proteins involved in calcium homeostasis, 9 transcription factors,

3 Na^+/K^+ ATPase subunits, 2 cytoskeletal proteins, 10 specific markers of cardiac regions, vessels, neuronal tissue, fibroblasts, inflammation and hypertrophy, and 4 endogenous control genes used for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation by the Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed using the threshold cycle (Ct) relative-quantification method.[14] Seven genes (Nav1.1, Nav1.7, TWIK1, TREK1, TASK2, MIRP4 and KChIP1) were eliminated for lack of detection (> 50% of undetermined data). The remaining genes (89) exhibited no undetermined data point. We selected the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene for data normalization, as the most uniformly distributed gene. The relative expression of each gene *versus* HPRT was calculated for each sample (ΔCt indicates normalized data). The outliers (a maximum of one value per group) were excluded using a robust statistical method based on tabularized Dixon distribution.[15] Data were analyzed independently using two distinct procedures. The first one, two-way hierarchical agglomerative clustering, was applied to the gene-expression matrix consisting of 40 tissue samples and the 64 genes involved in electrical signaling. The input consisted of the ΔCt for each gene and sample. We applied average linkage clustering with Pearson correlation using the Cluster software.[16] Clusters were visualized using the Treeview software. The second procedure consisted in calculating means ± SEM of the 2-ΔCt for each gene and each group. Since all fluorescent probes had 100% PCR efficiency (Applied Biosystems application note), expression levels among ventricular samples and among genes were compared.

Western blots

Protein samples were prepared from the left ventricle of control, CAVB H12,

CAVB D1, CAVB D2 and CAVB D5 mice (n = 4 per group) using previously described method.[17] Proteins were fractionated on either 10% SDS-polyacrylamide gels (for KChIP2) or 4-12% NuPAGE® Novex Bis-Tris gels from Invitrogen™ (Kv4.2) and transferred on Nitrocellulose membranes (Hybond™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Membranes were blocked and incubated with polyclonal or monoclonal antibodies targeted against Kv4.2 (Alomone Labs, Israel) and KChIP2 (a kind gift from James S Trimmer, University of California, Davis, USA).[18] In addition, a polyclonal anti-GAPDH antibody (Alomone Labs) was used as an external/internal control. After washing, membranes were incubated with goat peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (Alomone Labs). Membranes were then washed and signals from immunoreactive bands were detected by ECL (Perkin Elmer, USA) and quantified using QuantityOne program (Bio-Rad, USA). The densities of individual bands were quantified by summing the pixel values above background within a defined area surrounding each band and expressed relative to the value for the corresponding GAPDH band. To compare the Kv subunit expression levels between CAVB mouse ventricles and control mouse ventricles, these values were then expressed relative to the values for the control mouse value measured from the analysis of the same film.

Patch-clamp experiments

Isolation of myocytes. The procedure for isolating myocytes has been described elsewhere.[19] Briefly, control, CAVB D1 and CAVB D5 mice were heparinized (600 IU/kg i.p.) and killed under anesthesia (etomidate 35 mg/kg i.p.). The hearts were quickly excised and retrogradely perfused through the aorta. Single myocytes were isolated enzymatically (type 2 collagenase, Worthington, USA;

protease XIV, Sigma, USA) from the left ventricular free wall.

Electrophysiological recording. Whole-cell voltage-clamp technique was used for recording membrane currents. Cells were superfused at room temperature with an extracellular solution containing (in mmol/L): N-Methyl-D-Glucamine, 130; KCl, 5.4; $MgSO_4$, 1.2; HEPES, 10; glucose, 10; mannitol, 10; pH adjusted to 7.4 with HCl. Substitution of NaCl by N-Methyl-D-Glucamine suppressed the Na^+ current. The addition of 3 µmol/L nifedipine blocked the L-type Ca^{2+} current. Patch pipettes had tip resistances of 2.0-3.0 MΩ. They were filled with a solution containing (in mmol/L): KCl, 20; K-aspartate, 110; HEPES, 5; $MgCl_2$, 2 (free-Mg^{2+}: 0.6); K_2ATP, 5; $CaCl_2$, 1; pH 7.2 with KOH. K^+ currents were elicited by applying at 3-s intervals a 500-ms voltage step to +30 mV from a holding potential (HP) of -80 mV. The transient outward current, I_{to}, was obtained by subtracting the current recorded after a 100-ms inactivating prepulse to -40 mV to the currents obtained from a HP of -80 mV.[20]

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM. In real-time RT-PCR experiments, groups were compared for every gene and statistical differences were identified using one-way analysis of variance completed by a Tukey test. For functional studies and western blots statistical analysis was performed with Student *t*-test, Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks and one-way analysis of variance completed by a Tukey test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Complete atrioventricular block and early arrhythmias in the mouse

Figure 1 shows a representative induction of complete (third degree) AVB in a mouse. CAVB was induced successfully in 52/109 mice (47.7%) after 1 (34/109), 2 (11/109) or 3 (7/109) shoots. Increasing further the number of shoots did not improve the success rate. Our preliminary investigations showed that increasing the energy power above 2.5 W or increasing the shoot duration above 15 s was detrimental to the heart. Among the 52 mice with successful ablation of the His bundle, 9 (17.3%) partially recovered from CAVB during follow-up and showed 2:1 or 3:1 AVB. These mice were excluded from the present study. In freely moving animals, the mouse heart rate was about 600 cycles/min in sinus rhythm and 94 ± 5 cycles/min 6 hours after CAVB. Later on, the escape rhythm progressively accelerated being 110 ± 9 cycles/min at H12, 122 ± 23 cycles/min at D1 and 125 ± 9 cycles/min at D2. Thus the period with more severe bradycardia was the first 24 hours.

Per operative mortality was high particularly during the first 24 hours. Thirty-three % of the mice in CAVB died before 24 h, 9% before 48 h and 2% before day 5. Thus, only 56% survived up to day 5. Upon long-term follow-up performed in a previous study,[21] secondary mortality was observed 2-4 months after the procedure and was attributed to end-stage heart failure.

As shown in Table 1, ablation of the His bundle induced a marked prolongation of the RR interval which, as expected, associated with a dramatic lengthening of the QT interval. QRS interval was also prolonged. These two parameters progressively increased with time after CAVB, suggesting that both ventricular conduction and repolarization were progressively impaired. Interestingly, the PP interval after CAVB was significantly shortened suggesting an increased β-adrenergic input. This was particularly evident during the first 24 hours after His

bundle ablation.

Seventeen mice were implanted with a telemetric device before His bundle ablation. CAVB was successfully induced in 9/17. During the first 24 hours (and in most cases during the first 12 hours) 6/9 exhibited repetitive episodes of polymorphic ventricular tachycardia clearly resembling torsades de pointes in humans (Figure 2). Up to 130 episodes of ventricular tachycardia per day were observed on telemetry recordings. The number of daily episodes tended to decrease after day 2. Four mice died during telemetry recordings (2 with arrhythmias and 2 without; 2 at day 1, 1 at day 3 and 1 at day 4). In every case, death resulted from progressive slowing of the idioventricular escape rhythm down to complete extinction. Thus, mice did not die from their arrhythmias but rather from extreme bradycardia (Figure 2C).

Molecular markers for hypertrophy and hemodynamics

CAVB induced a progressive cardiac hypertrophy. The heart weight increased progressively from 136 ± 2 mg in control mice (n = 15) to 159 ± 4 mg at day 2 (n = 15; $p < 0.001$ *versus* control) and 179 ± 2 mg at day 5 (n = 15; $p < 0.001$ *versus* control; $p < 0.001$ versus day 2) post-CAVB. At day 1, there was no significant change in heart weight (143 ± 3 mg). Because mice exhibited transient loss of body weight after CAVB, we evaluated the heart weight to tibialis length ratio in subgroups of 6 animals per condition. This ratio increased from 5.9 ± 0.1 in control mice to 6.9 ± 0.2 at day 2 ($p < 0.001$ *versus* control) and 8.1 ± 0.2 at day 5 ($p < 0.001$ *versus* control; $p < 0.001$ *versus* day 2) post-CAVB. There was no significant change at day 1 (6.3 ± 0.2).

Increased heart weight was associated with alterations in the expression of genes encoding contractile proteins and markers of hypertrophy, also evidenced at

day 2 (Figure 3). Skeletal α-actin and β-MHC, which are expressed at low levels in the healthy mouse heart, were significantly up-regulated. The expression of cardiac α-actin was also increased. In contrast, expression of ventricular type 2 myosin light chain (MLC2V) and cardiac troponin I was down-regulated. Finally, genes encoding brain natriuretic peptide (BNP) and procollagen were up-regulated. Thus, CAVB mice underwent cardiac hypertrophic rearrangement after day 2 whereas their ventricular arrhythmias occurred during the first 24 hours, *i.e.* before cardiac hypertrophy.

Using Millar catheters, we also evaluated left ventricular pressure, contractility (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) at D5 post-ablation. The systolic blood pressure was comparable in control and CAVB D5 mice (92.5 ± 5.4 mmHg *versus* 89.0 ± 4.3 mmHg, respectively; n = 6 and 4) whereas, as expected, diastolic pressure was lower in CAVB D5 animals (27.2 ± 0.9 *versus* 51.6 ± 3.9 mmHg; $p<0.01$). Contractility was conserved in CAVB D5 mice (+dP/dt was 6534 ± 620 mmHg/sec in control *versus* 6075 ± 1010 mmHg/sec in CAVB D5 mice) whereas relaxation was consistently decreased (-dP/dt: -6007 ± 425 mmHg/sec in control *versus* -4294 ± 281 mmHg/sec in CAVB D5; $p<0.02$). We interpret these data as indicating compensated cardiac hypertrophy at day 5 post-CAVB.

Early remodeling of ion channel gene expression

An overview of gene expression data is provided by a two-way hierarchical clustering analysis of genes and cardiac tissues (Figure 4). In this global analysis, the samples are linked to a tree. The size of the tree branches indicates the distance between the clusters: higher is the branch size, more significant is the separation between the clusters. Hierarchical clustering showed that control mice clustered with sham mice. Consequently, in further experiments, mice in CAVB were compared to

control mice. Hierarchical clustering also indicated that CAVB H12 mice separated from control or sham demonstrating early remodeling. CAVB H12 mice clustered together with most CAVB D1 mice but separately from CAVB D2 or D5 mice. CAVB D2 and D5 mice clustered together in a common tree branch. We interpreted these data as suggesting the existence of two separate phases for molecular remodeling: (i) an early phase in the first 24 hours in relation to electrical remodeling and; (ii) a later phase in relation to the hypertrophy process. Noteworthy, mice in CAVB for 12 hours presented their own specific pattern of expression with genes either up- or down-regulated in comparison with other groups (clusters C and D on Figure 4). Also, mice in CAVB for at least 48 hours (CAVB D2 and D5) exhibited their own distinct portrait (clusters A and B).

Figures 5-7 show the effects of CAVB on individual patterns of expression of a subset of genes encoding ion channel subunits and Ca^{2+} homeostasis regulators, *i.e.* those with the larger expression changes. Results obtained for all investigated genes are presented in supplementary Table 2. Among the voltage-gated Na^{+} channel subunits, the α-subunits Nav1.3 (*Scn3a* gene), Nav1.5 (*Scn5a*) and Nav2.3 (*Scn7a*) were transiently up-regulated whereas the β-subunit Navβ1 (*Scn1b*) was transiently down-regulated (Figure 5). Similarly, expression of both connexins 40 (*Gja5*) and 43 (*Gja1*) were transiently decreased. On the other hand, Nav1.4 (*Scn4a*) was progressively down-regulated, reaching a stable level of expression at day 2. Among the voltage-gated Ca^{2+} channel subunits (Figure 6), Cav3.1 (*Cacna1g*) was transiently down-regulated in CAVB H12 mice. In contrast, the L-type Ca^{2+} channel subunit Cav1.2 (*Cacna1c*) remained stable for 48 hours and was down-regulated after 5 days. CAVB also induced a complex regulation of the expression of genes encoding regulators of Ca^{2+} homeostasis (Figure 6). The sarcoplasmic reticulum

Ca^{2+}-ATPase, SERCA2 (*Atp2a2*) and its regulator phospholamban (PLB; *Pln* gene) were down-regulated. Regulation of the type 2 ryanodine receptor (*RyR2*) and Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX1 (*Slc8a1*) were complex. RyR2 expression first increased moderately (NS) before decreasing strongly at day 5. NCX1 expression was transiently up-regulated only at day 2. Finally, expression of type 1 calmodulin was moderately increased.

The expression of many voltage-gated K^+ channel subunits was also altered by CAVB (Figure 7). Among the α-subunits, Kv4.2 (*Kcnd2*) was transiently down-regulated at days 1 and 2 after AVB before its expression returned to control values at day 5. Other α-subunits were either up-regulated, such as Kv1.4 (*Kcna4*), Kv2.1 (*Kcnb1*) or KvLQT1 (*Kcnq1*) either rapidly (Kv2.1) or more progressively. Finally, Kv1.5 (*Kcna5*; data not shown) showed transient up-regulation: its expression increased 12 hours after His bundle ablation and then decreased back to control values at day 1. In contrast, among the voltage-gated K^+ channel β-subunits, only KChIP2 (*Kcnip2*) and minK (*Kcne1*) were regulated, both in a negative way. Among the inward rectifier K^+ channels, one of the α-subunits forming the pore of acetylcholine-activated K^+ channel $I_{K,Ach}$, Kir3.1 (*Kcnj3*) was down-regulated (data not shown). A similar pattern of regulation was observed for the cardiac sarcolemmal ATP-dependent K^+ channel α- (Kir6.2; *Kcnj11*) and β-subunits (SUR2; *Abcc9*). Kir6.1 (*Kcnj8*) was also down-regulated, but only at day 5 (data not shown). Finally, the expression of only one 2-pore K^+ channel, TASK (*Kcnk3*) was altered.

Functional correlation with molecular data

Myocardial hypertrophy has often been associated with a decreased expression of the transient outward current, I_{to}. In the mouse, I_{to} mainly results from

the association between Kv4.2, the α-subunit, and KChIP2, its β-subunit. Because these two genes showed different patterns of regulation (one transient, Kv4.2, and one progressive, KChIP2), western blots and whole patch-clamp recordings were conducted to investigate the functional consequences of these changes. As illustrated in Figure 8A, Kv4.2 protein expression was transiently down-regulated whereas KChIP2 was progressively down-regulated to reach significance at day 5 only, as previously observed at the transcript level. As a consequence, the amplitude of I_{to} was reduced significantly at day 1 and then returned to control values at day 5 (Figure 8B).

Discussion

In the present study, we report a novel model of CAVB in the mouse obtained by ablating conduction at the His bundle level. The model shows two distinct phases of adaptation to abrupt bradycardia and presumably reduced cardiac output: (i) an initial phase of electrical remodeling associated with spontaneous episodes of polymorphic ventricular tachycardia which developed <24 hours post-AVB; (ii) a later phase >24 hours post-AVB in relation to structural remodeling and adaptive cardiac hypertrophy. This later phase is characterized by the expression of hypertrophic markers, increased cardiac weight but conserved contractility. Many molecular rearrangements, which occurred during this phase, are typical for myocardial hypertrophic processes. These include down-expression of RYR2, SERCA2 and phospholamban[22,23,24] and also transient down-expression of Kv4.2[25,26] and sustained expression of KChiP2[27] and minK.[28]

During the initial phase of cardiac adaptation to idioventricular rhythm (<24-hours), electrical remodeling occurred in the absence of cell hypertrophy. Most remarkably, this initial phase is characterized by an early fall in the expression of Kv4.2 and KChIP2 visible at the level of mRNA, protein and at the functional level as a decrease in the fast inactivating transient outward current, $I_{to,f}$. Inversely to the dog, $I_{to,f}$ plays a major role to repolarize mouse ventricle short action potentials whereas the delayed K^+ currents, I_{Kr} and I_{Ks}, play little role if any. In the dog as in the rabbit, the prominent effect of CAVB is a reduction in the amplitude of I_{Kr} and I_{Ks} whereas $I_{to,f}$ is unaffected at least during the initial stages.[6,8,9] Thus, depending on the species, reduction in the prominent repolarizing current (either the delayed rectifier or the transient outward current) is central to the electrical remodeling resulting from CAVB. In rodent ventricles, KChIP2 is uniformly expressed, and regional differences in $I_{to,f}$ densities are correlated with heterogeneities in Kv4.2 expression.[29] The situation is different in the dog where the transmural gradient in $I_{to,f}$ is carried by differential expression of KChIP2.[17] Thus in the mouse, Kv4.2 expression is the main determinant of $I_{to,f}$ whereas KChIP2 plays a less important role. This matches our findings where a transient decrease in Kv4.2 results in a transient decrease in $I_{to,f}$ in spite of a sustained decrease in KChIP2. It is difficult to establish whether early reduction in Kv4.2 and KChIP2 is a primary signal that precedes activation of hypertrophic markers or whether early and late down-regulation of these genes originated from different mechanisms. The signal that governs decreased expression of Kv4.2 and KChIP2 transcripts is at present unknown. It has been recently proposed that the homeodomain transcription factors IRX5 and IRX3 repress Kv4.2 expression.[30,31] Kv4.2 expression has also been related to GATA4 expression.[32] Furthermore, MEF2a over expressing myocytes display a reduction in I_{to} consistent

with a decrease in Kv4.2 mRNA expression.[33] Positive regulation of KChiP2 expression by cAMP response element binding protein (CREB1) has also been recently reported.[34] Jia and Takimoto have shown that KChIP2 mRNA level is controlled by the JNK and MEK-ERK mitogen-activated protein kinase pathways.[35] In the same line, expression of both Kv4.2 and KChIP2 is under control of the calcineurin/NFAT activity, which is required for their down-regulation.[36] Based on these findings, we compared the mRNA expression of certain members of the IRX, GATA, MEF2, CREB, AP-1 and NFAT families between control mice and mice in CAVB for 12 hours, 1 day, 2 days and 5 days (supplementary Table 2). In relation with the previously mentioned transcriptional regulations, we found an up-regulation as early as 12 h of IRX3 (more than 2 fold; $p< 0.001$ *versus* control group), ATF3 (almost 12 fold; $p< 0.01$), c-Fos (2 fold; $p< 0.01$) and no modification of NFATC3. Surprisingly, MEF2a was down-regulated by 44% ($p< 0.001$) as early as 12 hours after CAVB induction and GATA4 mRNA expression was not modified. Obviously, much more work should be conducted before the relation between transcription factors and expression of ion channel subunits generating I_{to} is elucidated.

QT interval prolongation and associated predisposition to torsades de pointes are a hallmark of strong bradycardia in patients[37,38] and animal models.[1,2,8,9] Our study confirms this finding in the mouse model with two major differences. First, in our model, arrhythmias occurred much earlier. This may be the consequence of the more profound degree of bradycardia as suggested previously in the rabbit model.[8,9] Second, the ionic mechanisms might be different since ionic currents involved in mouse cardiac repolarization differ markedly from those in rabbits, dogs or humans. The mechanisms leading to polymorphic ventricular tachycardia in CAVB mice is debatable. Whether electrical remodeling and more specifically early decreased

Kv4.2 and KChIP2 are a substrate for arrhythmogenesis in this model is unclear. Complete loss of I_{to} in KChIP2 knock-out mice has been reported to confer susceptibility to pacing-induced polymorphic ventricular tachycardia.[39] However, in our model, occurrence of arrhythmias precedes Kv4.2 and KChIP2 remodeling. Among the early regulated genes is *Kcne1* which is down-regulated. Interestingly, although *Kcne1*-gene product, the K^+ channel auxiliary subunit, minK, does not seem to play a major role in adult mouse cardiac repolarization,[40,41,42] *Kcne1* knock-out mice exhibit higher susceptibility to ventricular[43] arrhythmias. In this model, ventricular arrhythmias are favored by adrenergic stimulation and prevented by a Ca^{2+} channel inhibitor. *Kcne1* disruption leads to a wider spread of conduction velocities which could favor reentry, a likely mechanism for continued propagation of torsades de pointes induced by early afterdepolarizations in the context of long QT.[44] Other potentially proarrhythmic rearrangements include decreased Cx43 expression. Although this latter effect is modest in amplitude (< 50%) and thus is not expected to influence cardiac conduction and arrhythmogenesis in normal conditions, it might participate to the arrhythmogenic substrate in our model.[45] Finally, beside the arrhythmogenic potential of early ionic remodeling, it is most probable that the combination of strong bradycardia, prolonged ventricular repolarization and high sympathetic input (as assessed by the decrease in PP interval), that is expected to increase L-type Ca^{2+} current and disturb intracellular Ca^{2+} regulation, would be sufficient to induce early afterdepolarizations and arrhythmias.

In summary, we report a new model of CAVB in the mouse and describe the time-course of molecular remodeling, which evolves according to two phases: one early phase related to stress leading to ventricular arrhythmias and a later phase related to cardiac hypertrophy. The model provides a unique opportunity to link

altered transcription pathways and ion channel remodeling. With the aim to elucidate arrhythmogenesis, further studies will be conducted with the CABV model by making use of mice knock-out for genes encoding key ion channels (*e.g.* Kv4.2-/- or KChiP2-/- mice) or transcription factors (*e.g.* Irx5 -/-), a powerful approach that is not possible with the dog or rabbit models.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation de France (SD-DE) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR "Cardiovasculaire, obésité, diabète; FC). The authors wish to thank Béatrice Le Ray, Marie-Jo Louérat and Agnès Carcouët (Inserm U533) for expert technical assistance. They also express their gratitude to Céline Fiset (Montreal Heart Institute) for helpful advice with Kv4.2 western blots.

1

References

[1] Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, van der Zande J, Leunissen HD, Cleutjens JP, van Bilsen M, Daemen MJ, Schreuder JJ, Allessie 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.

[2] van Opstal JM, Verduyn SC, Leunissen HD, de Groot SH, Wellens HJ, and Vos MA. Electrophysiological parameters indicative of sudden cardiac death in the dog with chronic complete AV-block. *Cardiovasc Res* 50: 354-361, 2001.

[3] van Opstal JM, Schoenmakers M, Verduyn SC, de Groot SH, Leunissen JD, van Der Hulst FF, Molenschot MM, Wellens HJ, and Vos MA. Chronic amiodarone evokes no torsade de pointes arrhythmias despite QT lengthening in an animal model of acquired long-QT syndrome. *Circulation* 104: 2722-2727, 2001.

[4] Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, Beekman JD, de Pater G, van Opstal J, Volders PG, and Vos MA. Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. *Circulation* 110: 2453-2459, 2004.

[5] 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.

[6] Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Spatjens RL, Leunissen JD, Carmeliet E, and Wellens HJ. Downregulation of delayed rectifier K(+) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 100:

2455-2461, 1999.

[7] Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, and Vos MA. Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102: 2137-2144, 2000.

[8] Tsuji Y, Opthof T, Yasui K, Inden Y, Takemura H, Niwa N, Lu Z, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, and Kodama I. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation* 106: 2012-2018, 2002.

[9] Suto F, Zhu W, Cahill SA, Greenwald I, Navarro AL, and Gross GJ. Ventricular rate determines early bradycardic electrical remodeling. *Heart Rhythm* 2: 293-300, 2005.

[10] Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, and Escande D. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res* 89: 944-956, 2001.

[11] 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.* 2001;50:328-334.

[12] 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.

[13] 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.* 2005;562:223-34.

[14] 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.* 2001;25:402-408.

[15] Rorabacher DB. Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon Q Parameter and Related Subrange Ratios at the 95 percent Confidence Level. *Anal Chem.* 1991;63:139-146.

[16] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, and Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;14:863-868.

[17] Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM, and McKinnon D. Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol* 2003;548: 815-822.

[18] Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, and Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K^+ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol.* 2004;559:103-120.

[19] 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, 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.* 2003;92:234-242.

[20] Brouillette J, Clark RB, Giles WR, and Fiset C. Functional properties of K+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-98.

[21] Piron J, Quang KL, Briec F, Amirault JC, Leoni AL, Desigaux L, Escande D, Pitard B, Charpentier F. Biological pacemaker engineered by nonviral gene transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. *Mol Ther* 16:1937-1943, 2008.

[22] Tomaselli GF, and Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270-283, 1999.

[23] Hill JA. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 13: 316-322, 2003.

[24] Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 61: 208-217, 2004.

[25] Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, and Levitan ES. Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K+ channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 81: 533-539, 1997.

[26] Lee JK, Nishiyama A, Kambe F, Seo H, Takeuchi S, Kamiya K, Kodama I, and Toyama J. Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 277: H1725-1731, 1999.

[27] Jia Y, and Takimoto K. Mitogen-activated protein kinases control cardiac KChIP2 gene expression. *Circ Res* 98: 386-393, 2006.

[28] Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C, and Dumaine R. Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I(Ks) in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res* 57: 486-496, 2003.

[29] Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, and Nerbonne JM. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K+ currents. *Circ Res* 90: 586–593, 2002.

[30] Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, and Bruneau BG. The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 123: 347-358, 2005.

[31] Rosati B, Grau F, and McKinnon D. Regional variation in mRNA transcript abundance within the ventricular wall. *J Mol Cell Cardiol* 40: 295-302, 2006.

[32] Jia Y, and Takimoto K. GATA and FOG2 transcription factors differentially regulate the promoter for Kv4.2 K(+) channel gene in cardiac myocytes and PC12 cells. *Cardiovasc Res* 60: 278-287, 2003.

[33] Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, and Molkentin JD. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J Biol Chem* 281: 9152-62, 2006.

[34] Patberg KW, Obreztchikova MN, Giardina SF, Symes AJ, Plotnikov AN, Qu J, Chandra P, McKinnon D, Liou SR, Rybin AV, Shlapakova I, Danilo P Jr, Yang J, and Rosen MR. The cAMP response element binding protein modulates expression of the transient outward current: implications for cardiac memory. *Cardiovasc Res* 68: 259-267, 2005.

[35] Jia Y, and Takimoto K. Mitogen-activated protein kinases control cardiac KChIP2

gene expression. *Circ Res* 98: 386-93, 2006.

[36] Rossow CF, Dilly KW, and Santana LF. Differential calcineurin/NFATc3 activity contributes to the Ito transmural gradient in the mouse heart. *Circ Res* 98: 1306-13, 2006.

[37] Kurita T, Ohe T, Marui N, Aihara N, Takaki H, Kamakura S, Matsuhisa M, and Shimomura K. Bradycardia-induced abnormal QT prolongation in patients with complete atrioventricular block with torsades de pointes. *Am J Cardiol* 69: 628-633, 1992.

[38] Gladman G, Davis AM, Fogelman R, Hamilton RM, and Gow RM. Torsade de pointes, acquired complete heart block and inappropriately long QT in childhood. *Can J Cardiol* 12: 683-685, 1996.

[39] Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, and Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107: 801-813, 2001.

[40] Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, and Barhanin J. Involvement of IsK-associated K+ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res* 83: 95-102, 1998.

[41] Charpentier F, Mérot J, Riochet D, Le Marec H, and Escande D. Adult KCNE1-knockout mice exhibit a mild cardiac cellular phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 806-810, 1998.

[42] Kupershmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, and 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* 84: 146-152, 1999.

[43] Balasubramaniam R, Grace AA, Saumarez RC, Vandenberg JI, and Huang CL. Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1. *J Physiol* 552: 535-546, 2003.

[44] el-Sherif N, Caref EB, Yin H, and Restivo M. The electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome. Tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circ Res* 79: 474-492, 1996.

[45] van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, and de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.

Figure legends

Figure 1. Radiofrequency catheter-mediated His bundle ablation. **A.** View of the radiofrequency catheter inside the right ventricular cavity (RV). **B.** Representative surface lead 1 ECG (I) and right ventricular electrogram (RV) during a radiofrequency shoot of 15 s at an intensity of 2 W. **C.** Representative lead 1 ECG (I) and right ventricular electrogram (RV) before and after His bundle ablation (after warming-up of the escape ventricular rhythm). Enlargement of the traces in the inset allows visualization of the His bundle activity. P, P wave; R, QRS complex; A, atrial activity; H, His bundle activity; V, ventricular activity.

Figure 2. Representative telemetric recordings of arrhythmias obtained in three different mice within 12 hours (panels A and B) and 4 days (94 hours; panel C) after atrioventricular node ablation. **A.** Ventricular escape rhythm with occurrence of extrasystoles and shorts runs of ventricular tachycardia (VT; arrows). **B.** Representative episode of a self-terminating "torsade de pointes“-like polymorphic VT. Runs of VT were observed in 6/9 mice. **C.** Terminal bradycardia associated to death. Disappearance of ventricular escape rhythm (at 14:34:27) preceded sinus node extinction 50 s later.

Figure 3. Expression of genes encoding contractile proteins and markers of hypertrophy (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Time 0 corresponds to control ventricles. Graphs show the relative quantification *versus* hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase gene (HPRT) (Y-axis). Data are means $\pm$ sem from 6-7 left ventricles. $*$, $p< 0.05$; $**$, $p< 0.01$; $***$, $p< 0.001$ *versus*

control left ventricles (time 0).

Figure 4. Two-way hierarchical clustering applied to 64 genes (vertical axis) and to left ventricular free walls isolated from sham mice (n = 5), control mice (n = 7) and mice in complete atrioventricular block for 12 h (CAVB H12; n = 7), 1 day (CAVB D1; n = 7), 2 days (CAVB D2; n = 7) and 5 days (CAVB D5; n = 7). The input consisted of ΔCT for each preparation and gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each ventricular preparation 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). Grey boxes correspond to missing values. Five selected gene clusters are shown on the right (A-E). Clusters A and B contain genes that were, respectively, down-regulated and up-regulated in CAVB D2 and D5 mice. Clusters C and D discriminate H12 mice from the other groups.

Figure 5. Expression of genes encoding Na^+ channel subunits, Connexins (Cx) and Na^+/K^+ ATPase subunits in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 6. Expression of genes encoding Ca^{2+} channel subunits and proteins involved in intracellular Ca^{2+} homeostasis in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 7. Expression of genes encoding K^+ channel subunits in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 8. A. Top. Representative Western blots probed with anti-Kv4.2 and anti-KChIP2 antibodies in ventricular tissues collected from control mice (C) and mice in complete atrioventricular block for 12 h (CAVB H12), 24 h (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5) respectively. The intensity of the signals obtained after treatment with anti-GAPDH antibody indicated that similar amounts of protein were loaded in the different wells. The molecular mass of the detected proteins is indicated on the right. **Bottom.** Corresponding bar graphs showing the average amount of proteins detected in left ventricular preparations of mice in atrioventricular block (in arbitrary units) as compared to control mice (value of 1). Data are means ± sem of 4 values in each group. *, **, $p< 0.05$ and $p< 0.01$ *versus* control, respectively. **B. Top.** Representative traces of the transient outward current (I_{to}) in a control mouse and in mice in AV block for 1 (CAVB D1) and 5 (CAVB D5) days. The dotted line indicates the 0 current level. Horizontal bar, 200 ms; vertical bar, 2 pA/pF. **Bottom.** Corresponding bar graph showing the average current density for control (n = 15), CAVB D1 (n = 13) and CAVB D5 (n = 14) myocytes. *, $p< 0.05$ *versus* control.

Tables

Table 1:

ECG parameters of control mice and mice in complete atrioventricular block for 12 hours (CAVB 12h), 1 day (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5).

	Control	CAVB 12h	CAVB D1	CAVB D2	CAVB D5
	n=15	n=14	n=15	n=15	n=15
PP (ms)	173±8	98±3 ***	110±3 ***	121±4 ***†	126±7 ***††
RR (ms)	173±8	406±40 ***	376±26 ***	419±43 ***	405±27 ***
QRS (ms)	12±1	16±1 **	17±1 ***	18±1 ***	18±1 ***
QT (ms)	60±2	97±4 ***	100±4 ***	109±3 ***	108±7 ***
QTcB	46±1	51±3	53±3	60±2 **	55±4
QTcF	50±1	63±3 *	66±3 **	73±2 ***	68±4 ***

Abbreviations are: PP, PP interval duration; RR, RR interval duration; QRS, QRS complex duration; QT, QT interval duration; QTcB, corrected QT interval according to modified Bazett's formula; QTcF, corrected QT interval according to modified Fridericia's formula.

Data are expressed as means ± sem.

*, **, ***, $p< 0.05$, $p< 0.01$ and $p< 0.001$, respectively, *versus* control mice.

†, ††, $p< 0.5$ and $p< 0.01$, respectively, *versus* CAVB 12h mice.

Table 2:

Baseline characteristics of control mice and mice in complete atrioventricular block for 12 hours (CAVB 12h), 1 day (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5).

	Control	CAVB 12h	CAVB D1	CAVB D2	CAVB D5
	n=15	n=14	n=15	n=15	n=15
HW (mg)	136±2	141±2	143±3	159±4 ***†††$$	179±2 ***†††$$$
HW/BW	4.7±0.1	4.7±0.1	5.1±0.1	5.7±0.2 ***†††$$	6.1±0.1 ***†††$$$

Abbreviations are: HW, heart weight; HW/BW, heart weight/body weight ratio.

Data are expressed as mean±sem.

**, ***, $p< 0.01$ and $p< 0.001$, respectively, *versus* control mice.

††, †††, $p< 0.01$ and $p< 0.001$, respectively, *versus* CAVB 12h mice.

$$, $$$, $p< 0.01$ and $p< 0.001$, respectively, *versus* CAVB D1 mice.

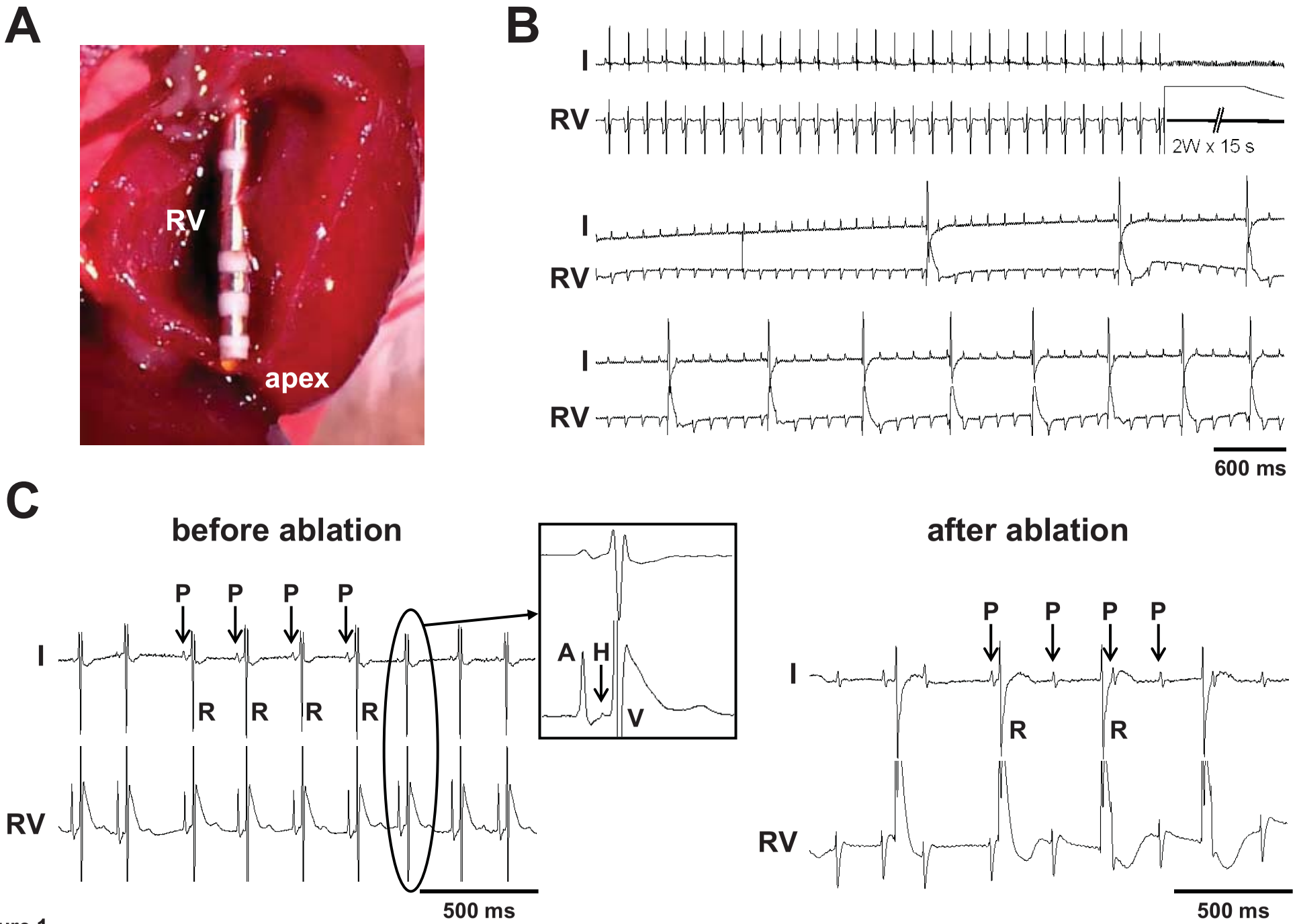
A
RV
apex
B
I
RV
2W x 15 s
I
RV
I
RV
600 ms
C
before ablation
P
P
P
P
I
R
R
R
R
RV
A
H
V
500 ms
after ablation
P
P
P
P
I
R
R
RV
500 ms

Figure 1

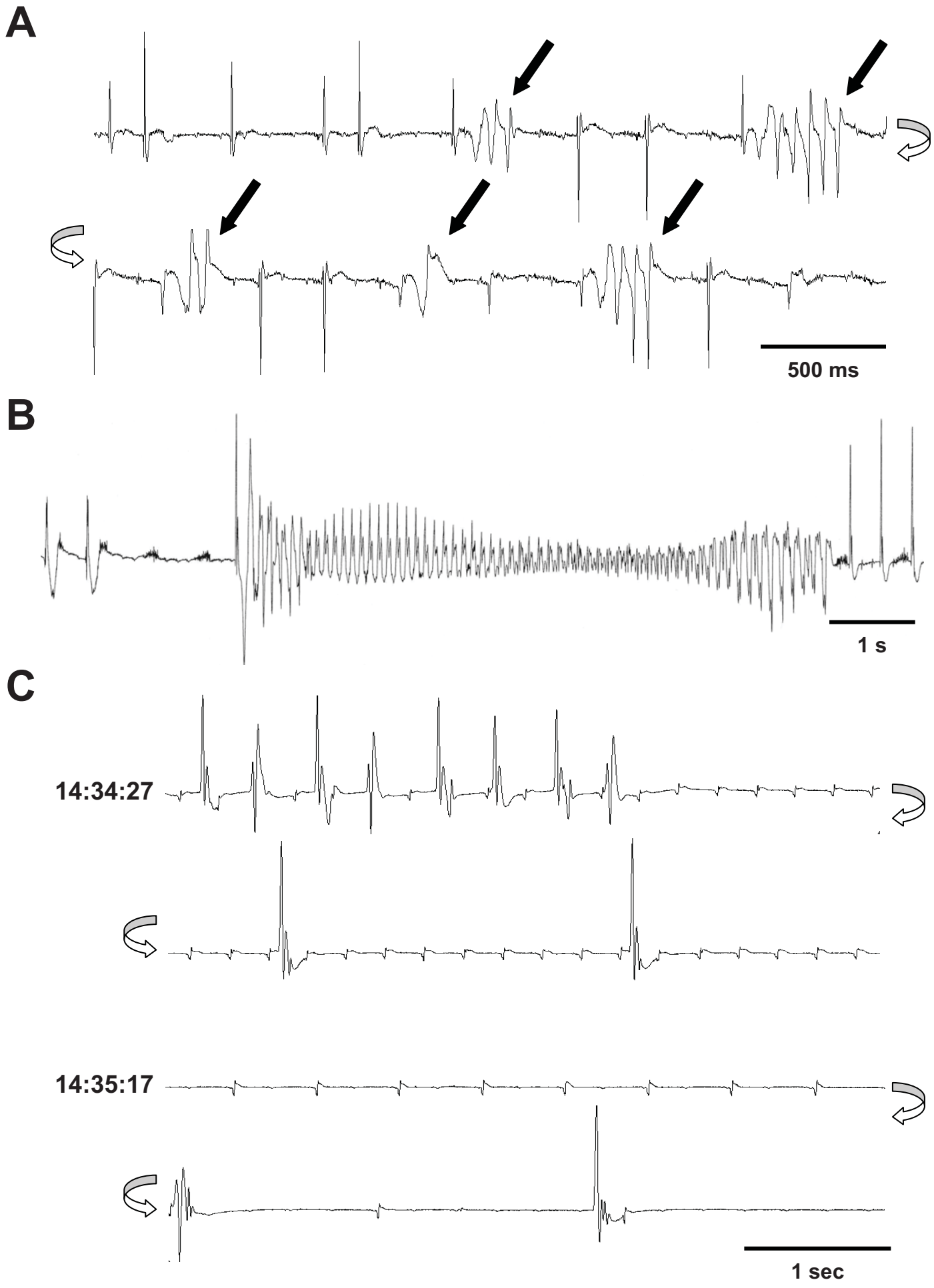

Figure 2

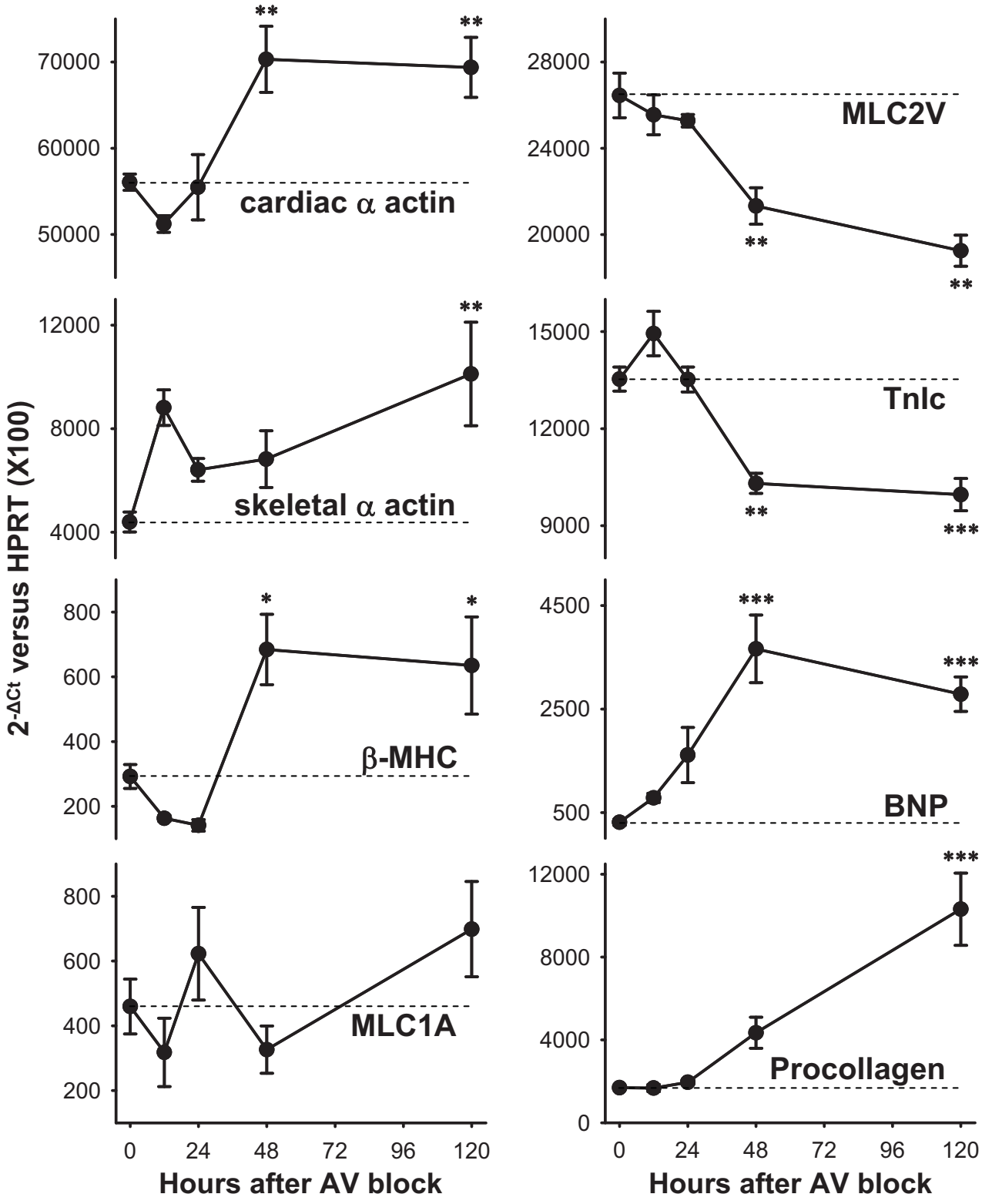
2-ΔCt versus HPRT (X100)
cardiac α actin
skeletal α actin
β-MHC
MLC1A
MLC2V
TnIc
BNP
Procollagen
Hours after AV block
Hours after AV block
0
24
48
72
96
120

Figure 3

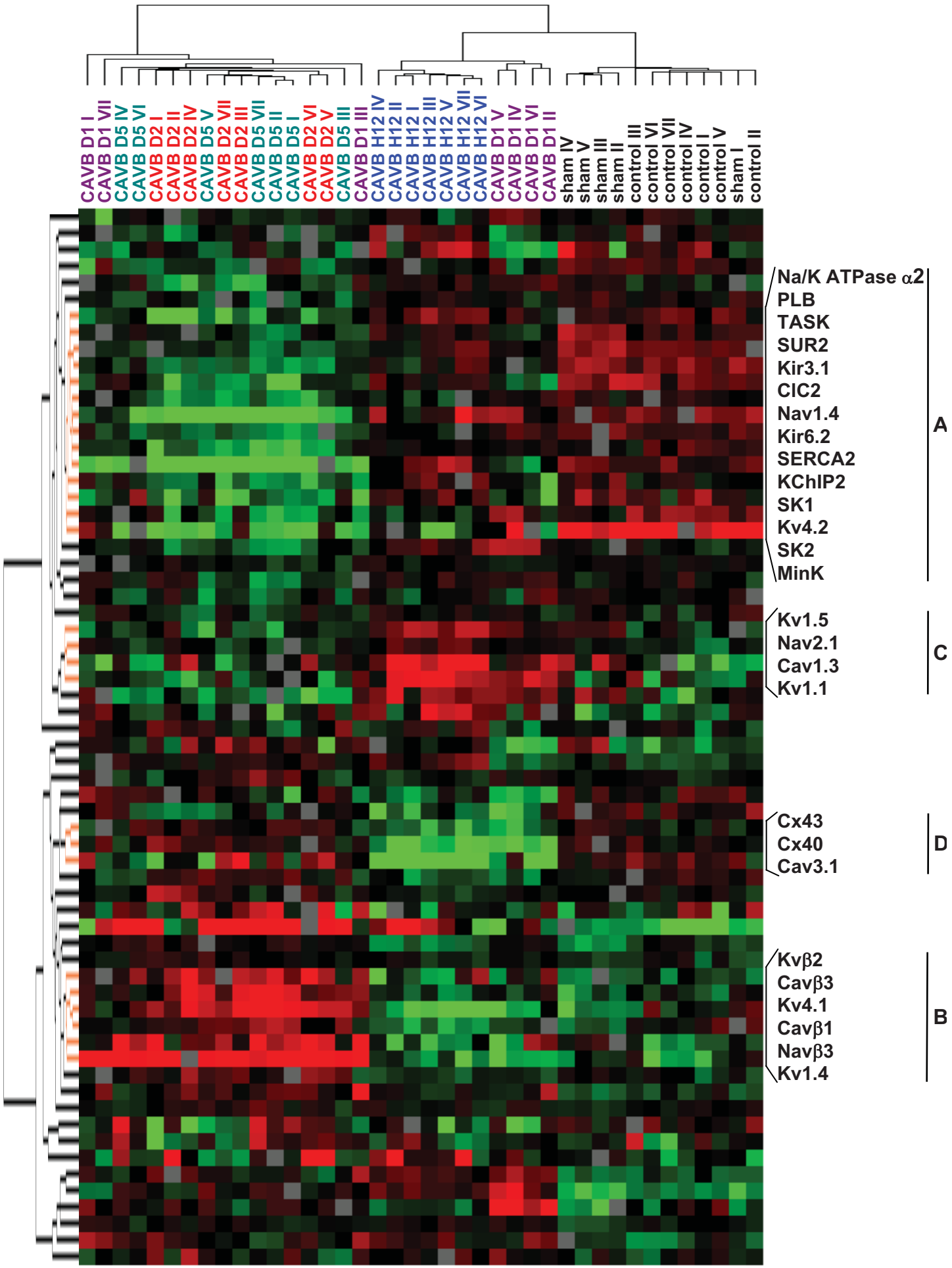
CAVB D1 I
CAVB D1 VII
CAVB D5 IV
CAVB D5 VI
CAVB D2 I
CAVB D2 II
CAVB D2 IV
CAVB D5 V
CAVB D2 VII
CAVB D2 III
CAVB D5 VII
CAVB D5 II
CAVB D5 I
CAVB D2 VI
CAVB D2 V
CAVB D5 III
CAVB D1 III
CAVB H12 IV
CAVB H12 II
CAVB H12 I
CAVB H12 III
CAVB H12 V
CAVB H12 VII
CAVB H12 VI
CAVB D1 V
CAVB D1 IV
CAVB D1 VI
CAVB D1 II
sham IV
sham V
sham III
sham II
control III
control VI
control VII
control IV
control I
control V
sham I
control II
Na/K ATPase α2
PLB
TASK
SUR2
Kir3.1
CIC2
Nav1.4
Kir6.2
SERCA2
KChIP2
SK1
Kv4.2
SK2
MinK
A
Kv1.5
Nav2.1
Cav1.3
Kv1.1
C
Cx43
Cx40
Cav3.1
D
Kvβ2
Cavβ3
Kv4.1
Cavβ1
Navβ3
Kv1.4
B

Figure 4

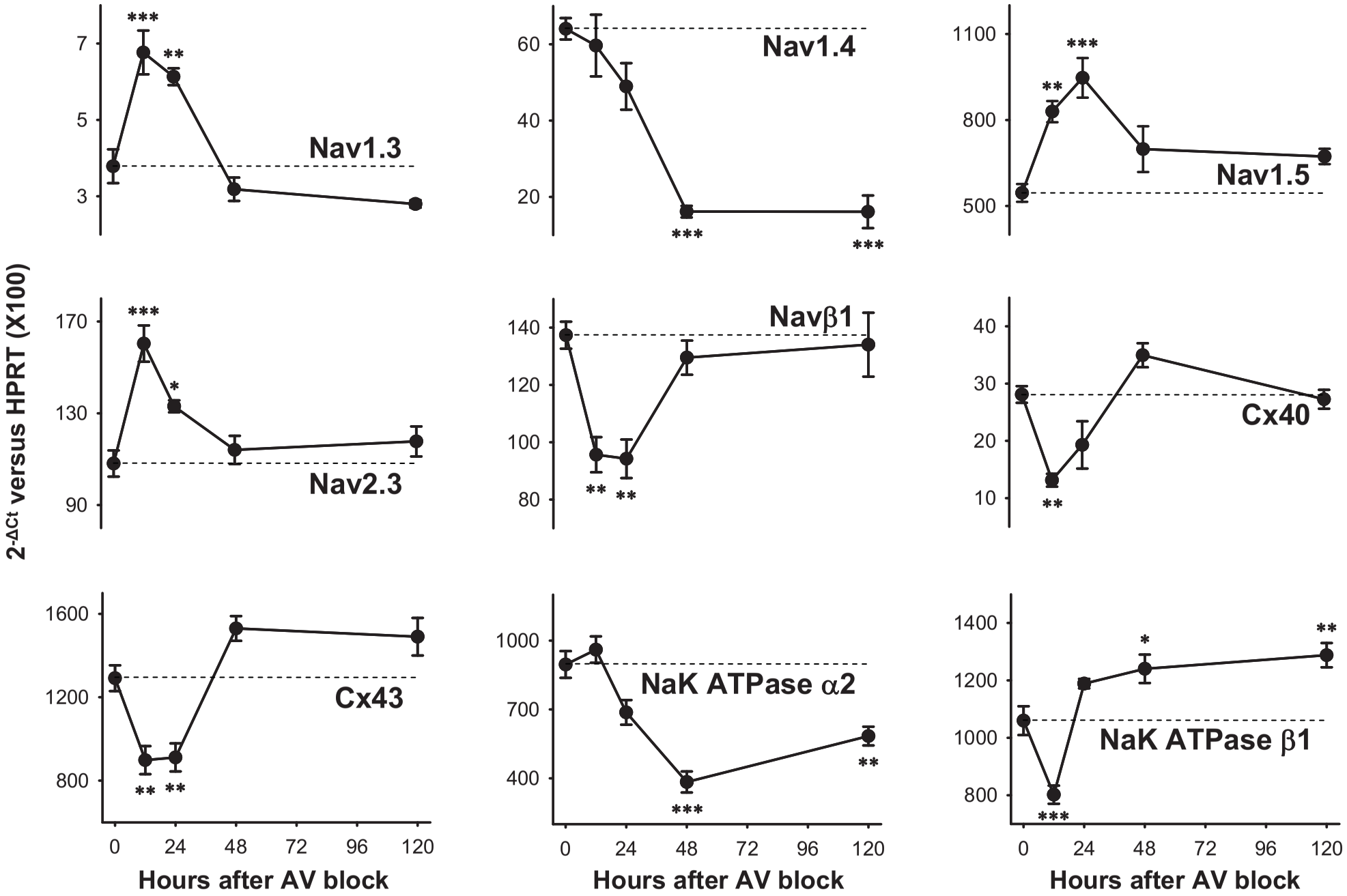
2-ΔCt versus HPRT (X100)
Nav1.3
Nav1.4
Nav1.5
Nav2.3
Navβ1
Cx40
Cx43
NaK ATPase α2
NaK ATPase β1
Hours after AV block
Hours after AV block
Hours after AV block

Figure 5

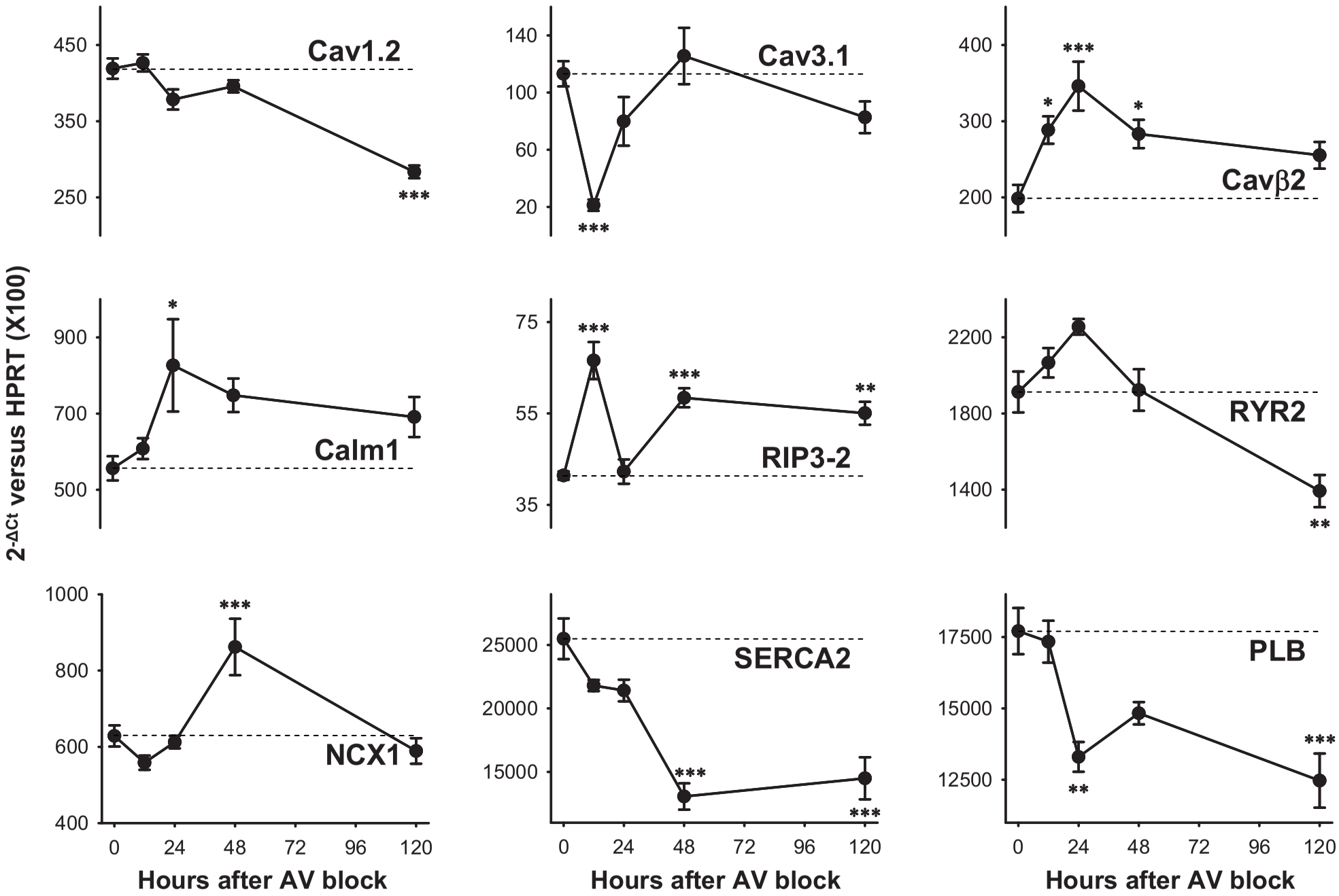
Cav1.2
Cav3.1
Cavβ2
Calm1
RIP3-2
RYR2
NCX1
SERCA2
PLB
2-ΔCt versus HPRT (X100)
Hours after AV block
Hours after AV block
Hours after AV block

Figure 6

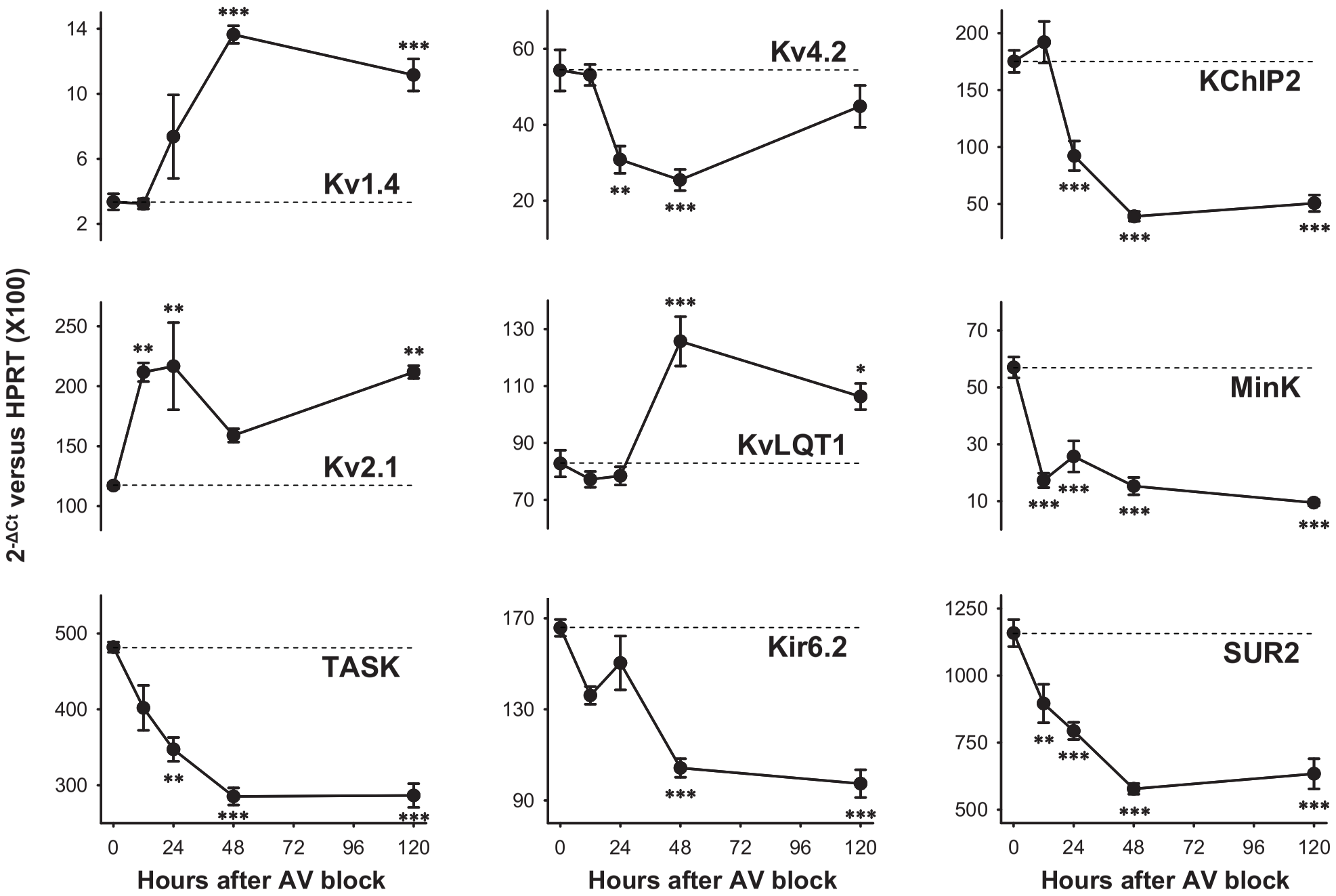
Kv1.4
Kv4.2
KChIP2
Kv2.1
KvLQT1
MinK
TASK
Kir6.2
SUR2
2-ΔCt versus HPRT (X100)
Hours after AV block
Hours after AV block
Hours after AV block

Figure 7

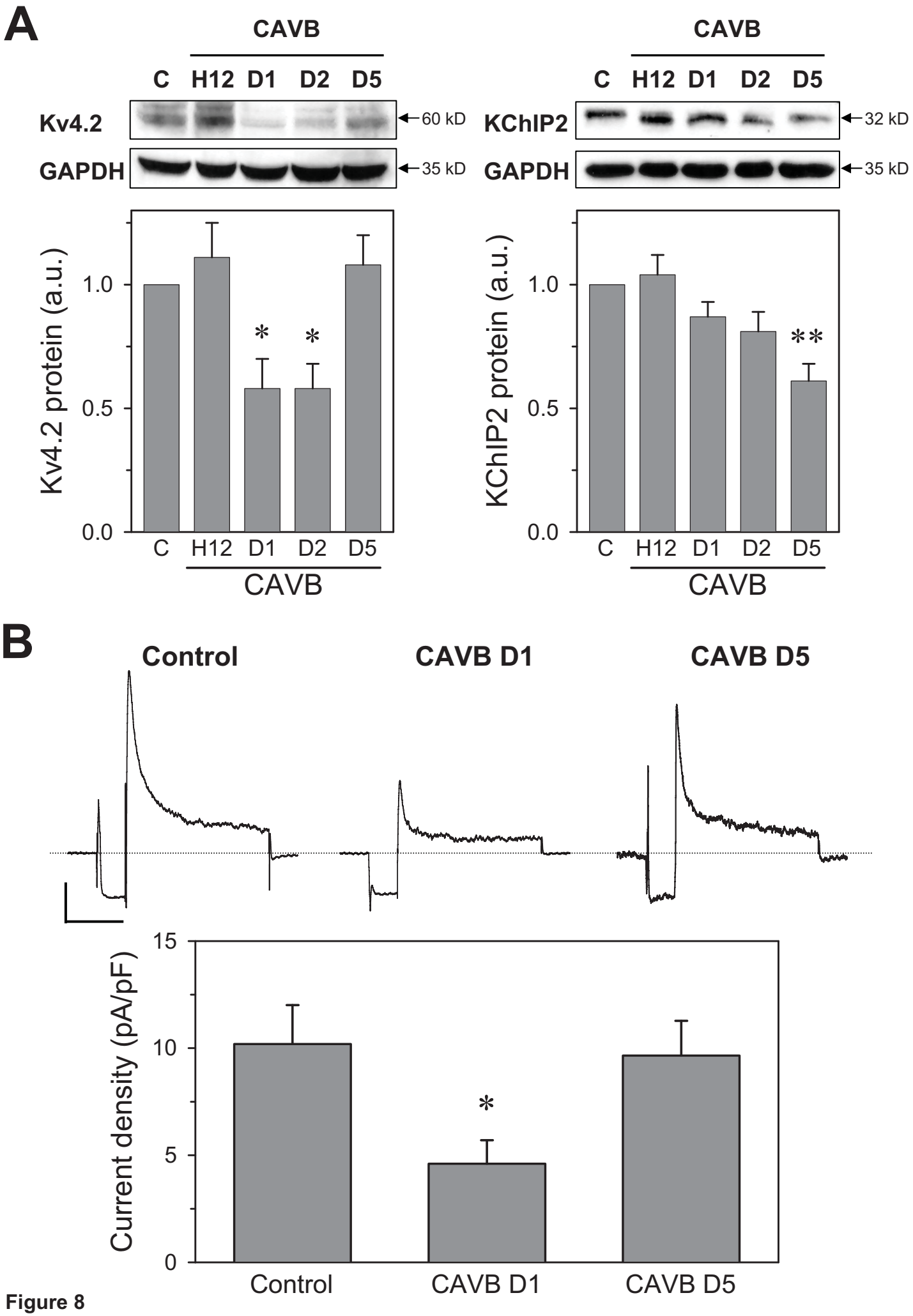
A
CAVB
C H12 D1 D2 D5
Kv4.2
GAPDH
60 kD
35 kD
KChIP2
32 kD
Kv4.2 protein (a.u.)
KChIP2 protein (a.u.)
1.0
0.5
0.0
*
**
B
Control
CAVB D1
CAVB D5
Current density (pA/pF)
15
10
5
0

Figure 8

Discussion complémentaire et perspectives

Nous avons privilégié la technique d'ablation du faisceau de His par radiofréquence. En effet, nous avions observée sur des coupes histologiques que la lésion induite par les courants de radiofréquence est restreinte au nœud AV et au faisceau de His. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de thoracotomie, de ventilation pulmonaire ou d'utilisation de substances chimiques (comme l'injection d'éthanol ou de formaldéhyde dans la région du nœud AV).

La survie de l'animal apparaît liée à l'utilisation ou non d'une période de stimulation ventriculaire juste après l'ablation. En absence de stimulation ventriculaire à un rythme plus physiologique que le rythme d'échappement ventriculaire, le taux de mortalité à la phase aigue du BAVc est proche de 100%. Il est possible que la stimulation ventriculaire programmée après ablation et lors de la détermination de la période réfractaire effective ventriculaire (PREV) préconditionne le myocarde à la perturbation hémodynamique : l'alternance de périodes de stimulation ventriculaire, durant lesquelles la perfusion coronaire est bonne, et de périodes non-stimulées, durant lesquelles la perfusion coronaire est diminuée, pourrait mimer une procédure de préconditionnement. Il est intéressant de noter que la PREV après ablation (PREV2) est allongée par rapport à PREV1 (avant ablation), ce qui suggère l'existence d'une altération très rapide de l'homéostasie ionique (figure 31). L'utilisation d'isoprénaline, agoniste ß-adrénergique non-sélectif, favorise probablement aussi la survie immédiate des animaux en augmentant la fréquence du rythme d'échappement ventriculaire. Dans notre modèle, la souris en BAVc n'a pas besoin d'implantation d'un stimulateur électronique pour survivre après la procédure contrairement à ce qui est observé sur les modèles du chien ou du lapin. Une étude à long terme nous a permis d'observer que les souris en BAVc peuvent vivre plus de 4 mois en rythme d'échappement idioventriculaire spontané, avec cependant des épisodes de tachycardie ventriculaire monomorphe ou polymorphe (torsades de pointes). L'analyse des ECG montre que l'intervalle PP est plus court chez les souris en BAVc que chez les souris contrôles, ce qui suggère la présence d'un tonus sympathique fort, favorisant la survie en rythme idioventriculaire. Le fait que la lésion induite par la radiofréquence soit limitée, au plus bas, au faisceau de His favorise probablement

l'expression de foyers d'échappement localisés relativement haut dans les branches du faisceau de His et donc plus rapides, ce qui n'est peut-être pas le cas chez le lapin après injection de formaline (Qi et al., 2009).

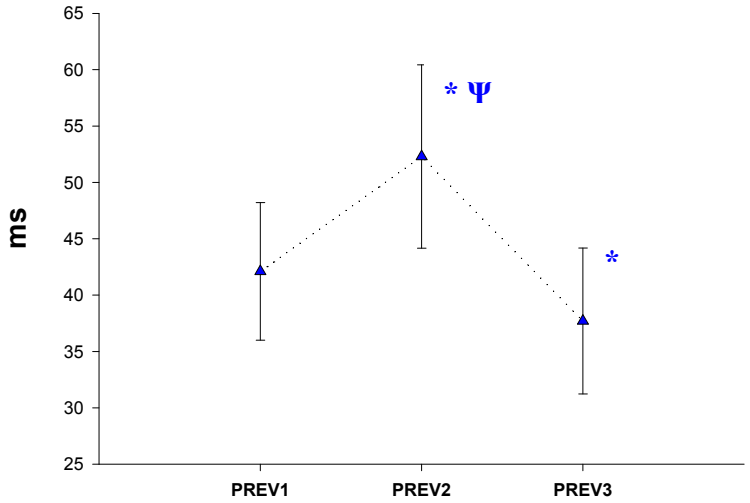

Figure 31 **:** *Les changements de la période réfractaire*

PREV1 *a été mesurée à l'état de base*

PREV2 *a été mesurée après la stimulation ventriculaire à 240 bpm pendant 5 min*

PREV3 *a été mesurée 5 min après injection d'isoprénaline (200 ng/g)*

** $p < 0.05$, par rapport à la PREV1*

Ψ $p < 0.05$, par rapport à la PREV3

Le BAVc divise le cœur en deux niveaux non connectés, les impulsions électriques de l'oreillette ne pouvant pas être transmises aux ventricules. La perte de contraction synchronisée auriculo-ventriculaire est la cause de perturbations hémodynamiques qui sont elles-mêmes à l'origine du remodelage cardiaque. Après ablation, les ventricules se contractent à un rythme d'échappement très lent de l'ordre de 160 bpm (RR = 372 ± *37* ms), diminuant ainsi le débit cardiaque et la perfusion coronaire ainsi que la perfusion des autres organes. Cette perturbation est probablement aggravée par la désynchronisation des rythmes auriculaire et ventriculaire qui va conduire à une diminution du remplissage des ventricules. Le fait que les oreillettes se contractent 4-5 fois plus souvent que les ventricules entraîne probablement une stase volumique dans

l'ensemble des cavités cardiaques, altérant ainsi leurs fonctions comme dans un modèle de surcharge volumique. Enfin, la diminution de la perfusion de l'organisme va activer de façon intense et permanente le tonus sympathique comme le démontre l'accélération du rythme sinusal que nous avons observée. La réponse du cœur en BAVc pour compenser une augmentation de la demande mécanique est la cause de l'hypertrophie biventriculaire avec une augmentation de poids du cœur.

L'expression de BNP, un indicateur d'une augmentation de la pression intracardiaque, est augmentée dès 12 heures après l'ablation du faisceau de His pour atteindre un maximum à J2. Il a été montré que le BNP est un marqueur de l'hypertrophie et de la surcharge cardiaque (Struthers, 2002). Ce résultat montre que le processus hypertrophique apparaît très tôt dans ce modèle.

Le Ca^{2+} joue un rôle central dans le couplage excitation-contraction. La relaxation se produit lorsque le Ca^{2+} est repompé par la SERCA2a, dont l'activité est contrôlée par le phospholambane (PLB), et séquestré dans le réticulum sarcoplasmique. Dans notre modèle, l'expression de SERCA2a diminue progressivement après le BAVc. L'expression du PLB est également diminuée fortement et plus rapidement (dès J1) que SERCA2a. Le ratio PLB/SERCA2a est augmenté pour atteindre un maximum à J2 et J5. Ce remodelage aura pour conséquence une altération de l'homéostasie calcique et une dégradation plus importante de la contraction (systole) et de la relaxation (diastole) qui conduiront progressivement à l'insuffisance cardiaque.

Remodelage électrique et troubles du rythme. L'étude électrophysiologique endocavitaire juste après l'ablation et le suivi électrocardiographique des animaux sur 5 jours montre une altération progressive des propriétés électriques cardiaques. Ainsi, l'onde P est prolongée après BAVc, suggérant une altération de la dépolarisation des oreillettes. L'allongement du complexe QRS juste après ablation est parfaitement attendu dans la mesure où l'activation ventriculaire résulte non plus d'une transmission hissienne de l'impulsion sinusale mais d'un foyer ventriculaire ectopique : la dépolarisation des ventricules suit un cheminement myocardique inhabituel avec une conduction ralentie. Cependant, le complexe QRS continue de s'allonger progressivement dans les jours qui suivent l'ablation du faisceau de His, suggérant une altération progressive de l'expression des protéines impliquées dans la conduction telles que les sous-unités du canal Na^{+} et les

connexines. La surexpression du gène codant le procollagène 1 suggère également l'apparition progressive de fibrose qui pourrait aussi altérer la conduction. Cette hypothèse reste à confirmer avec des études histologiques. L'intervalle QT est également prolongé après BAVc, ce qui démontre une altération de la repolarisation ventriculaire. L'allongement de l'intervalle QT est associé à un allongement de la PREV. Le syndrome du QT long est un problème clinique important (Roden et al., 2005), et la bradyarythmie est un précipitateur important de la torsade de pointes (Kurita et al., 1992). Ce modèle de souris en BAVc pourra être utilisé dans la recherche des facteurs de risque de la TdP en utilisant les souris transgéniques.

Le ralentissement de la conduction et l'allongement de la repolarisation sont deux facteurs arythmogènes. Ils sont associés dans notre modèle à l'apparition spontanée de troubles du rythme, sous la forme d'extrasystoles et de doublets, bigéminés ou non, et de tachycardie ventriculaire polymorphe, voire de torsades de pointes dans 67% des souris en BAVc (enregistrement continu en télémétrie). Ces troubles du rythme sont très précoces puisqu'ils surviennent dans les 12 premières heures. Dans le modèle de BAVc chez le chien, ce taux n'est que de 10% à 20% (van Opstal et al., 2001). Dans le modèle de lapin en BAVc par injection de formaldéhyde 37% dans le nœud AV, les auteurs ont démontré que le taux de troubles du rythme spontanés est plus élevé et comparable avec ce que nous observons, soit 71% (Tsuji et al., 2002).

Les souris qui surexpriment l'isoforme deltaC de la CAMKII développent une IC et sont plus susceptibles à la mort subite, le plus souvent après un épisode de tachycardie ventriculaire (Zhang et al., 2003). Il apparait ainsi envisageable que la CAMKII puisse contribuer à la survenue des tachycardies ventriculaires observées dans notre modèle. Il serait intéressant de réaliser un BAVc chez des souris KO-CAMKII et de comparer la susceptibilité aux arythmies post-BAVc. Si la CAMKII joue un rôle quel qu'il soit dans la survenue des arythmies observées dans notre modèle, nous pouvons ainsi envisager une diminution de la fréquence de la mort subite post-BAVc chez les souris KO-CAMKII, voire une prolongation de leur survie à long terme.

II. Création d'un pacemaker biologique cardiaque par transfert de gènes non-viral chez la souris.

Le nœud SA est le pacemaker naturel du cœur dont l'activité spontanée stimule le myocarde et permet l'orchestration entre l'excitation et la contraction cardiaque. Une perte de l'activité pacemaker du nœud SA, par conséquent, conduit à un collapsus circulatoire et demande une implantation d'un stimulateur électronique cardiaque. Un stimulateur est un générateur d'impulsions électriques. Les indications d'implantation d'un stimulateur cardiaque sont variées mais l'on retiendra essentiellement les patients avec bradycardie responsable de syncopes, que cette bradycardie soit due à une dysfonction du nœud SA ou à un bloc AV, chronique ou intermittent. Le patient porteur d'un stimulateur cardiaque mérite une attention toute particulière. La périodicité de surveillance la plus appropriée n'est pas parfaitement codifiée. L'habitude reconnait l'utilité de revoir les patients un à deux mois après l'implantation, puis régulièrement tous les six mois à tous les ans. Lorsqu'approche la fin de vie théorique de l'appareil, il convient d'accroitre le rythme des consultations. Toutefois, le coût élevé des appareils, et des complications telles que le collapsus pulmonaire, l'hémorragie, l'infection bactérienne, et l'altération de l'implant/générateur (boitier) représentent des limites de la technologie. Malgré une amélioration constante des stimulateurs cardiaques, en termes de durée de vie de batterie ou d'adaptation de la fréquence cardiaque aux activités physiques (Zivin et al., 2001) par exemple, il reste encore des obstacles à franchir comme (1) l'absence de régulation par le système nerveux autonome (aux demandes au cours d'exercice et d'émotion par exemple) ; (2) l'obligation des processus de surveillance et de maintenance, y compris de remplacement de la batterie et de l'électrode ; (3) un risque d'infection ou d'ingérence de la fonction d'autres appareils ; (4) le risque d'insuffisance cardiaque qui évolue avec un placement des électrode au site apical du ventricule droit et (5) les problèmes dans l'adaptation des équipements à la croissance et au développement des jeunes patients (Alt et al., 1989; Rosen, 2005).

Le premier stimulateur biologique cardiaque était fondé sur une surexpression des récepteurs β2-adrénergiques dans l'oreillette de porc (Edelberg et al., 2001). Le résultat fut une augmentation du taux basal auriculaire ainsi qu'une réactivité aux catécholamines. Tout en fournissant une preuve du concept que la stimulation biologique

pouvait être retenue, cette approche a constaté également des complications proarythmiques potentielles à cause d'action des catécholamines en excès sur le cœur. Un an plus tard, Miake et al. (2002) ont montré l'efficacité d'une thérapie génique chez le cobaye avec la création d'une pente de dépolarisation diastolique spontanée dans le myocarde ventriculaire. Le principe de la stratégie est que normalement le myocarde ventriculaire quiescent possède une capacité innée à la rythmicité, mais celle-ci est supprimée par la stimulation de "frein électrique" qui stabilise la membrane au potentiel de repos (rôle majeur du courant potassique IK_1/Kir2.1). En utilisant un adénovirus, une suppression de I_{K1} avec une surexpression d'une isoforme dominante négative de Kir2.1 a augmenté le rythme d'échappement idioventriculaire par rapport aux contrôles.

L'utilisation des gènes HCN2 et HCN4 codant pour les canaux générant I_f afin de générer des stimulateurs biologiques cardiaques a été rapportée. La plupart des travaux réalisés avec HCN2 ont utilisé des vecteurs viraux comme l'adénovirus ou le lentivirus (Qu et al., 2003; Plotnikov et al., 2004; Bucchi et al., 2006; Cai et al., 2007). Ces études ont montré que l'activité de pacemaker biologique est bien régulée par le système nerveux autonome (via l'interaction avec l'AMPc) sans problèmes proarythmiques (une stabilise de la durée du PA).

Dans l'optique de se rapprocher de l'utilisation d'un pacemaker biologique en situation clinique, nous avons décidé de créer un pacemaker biologique en utilisant un vecteur synthétique (non-viral) du type des blocs copolymères amphiphiles, le tétronic 304, et ce chez des souris en BAVc de notre laboratoire. Ce modèle pathologique permet un suivi à long terme du fonctionnement du pacemaker biologique induit par l'expression de deux transgènes : HCN2 et Adrb2, qui code le récepteur β2 adrénergique.

Cette étude a été publiée dans la revue *Molecular Therapy* en 2008.

Article 2 : **Biological Pacemaker Engineered by Nonviral Gene Transfer in a Mouse Model of Complete Atrioventricular Block**

Biological Pacemaker Engineered by Nonviral Gene Transfer in a Mouse Model of Complete Atrioventricular Block

Julien Piron[1–3], Khai Le Quang[1–3], François Briec[1–3], Jean-Christophe Amirault[1,3,4], Anne-Laure Leoni[1,3], Léa Desigaux[1,3], Denis Escande[1,3,4], Bruno Pitard[1,3,5] and Flavien Charpentier[1–4]

[1]INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, France; [2]CNRS, ERL 3147, Nantes, France; [3]Université de Nantes, UFR de Médecine, Nantes, France; [4]CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France; [5]In-Cell-Art, Nantes, France

We hypothesized that a nonviral gene delivery of the hyperpolarization-activated HCN2 channel combined with the β_2-adrenergic receptor (ADRB2) would generate a functional pacemaker in a mouse model of complete atrioventricular block (CAVB) induced by radiofrequency ablation of the His bundle. Plasmids encoding HCN2 and ADRB2 mixed with tetronic 304, a poloxamine block copolymer, were injected in the left ventricular free wall (HCN2-ADRB2 mice). Sham mice received a noncoding plasmid. CAVB was induced 5 days later. Ventricular escape rhythms in HCN2-ADRB2 mice were significantly faster than in sham mice at day 15 after ablation and later. In HCN2-ADRB2 mice, QRS complexes were larger than in sham mice and characterized by abnormal axes. Immunostaining of GFP-HCN2 fusion protein showed an expression of HCN2 channel in left ventricular myocardium for at least 45 days after injection. In the mouse, CAVB induces progressive hypertrophy and heart failure leading to 50% mortality after 110 days. HCN2-ADRB2 mice survived 3 weeks longer than sham mice. Finally, β-adrenergic input increased ventricular escape rhythms significantly more in HCN2-ADRB2 mice than in sham mice. In conclusion, nonviral gene transfer can produce a functional cardiac biological pacemaker regulated by sympathetic input, which improves life expectancy in a mouse model of CAVB.

Received 9 April 2008; accepted 29 August 2008; advance online publication 23 September 2008. doi:10.1038/mt.2008.209

INTRODUCTION

Although implantable electronic pacemakers remain the state-of-the-art therapy for high-degree heart blocks, they have shortcomings, leaving the field open for biological alternatives. Since the pioneer work of Miake *et al.*,[1] different studies have proven the feasibility of generating a functional biological pacemaker with appropriate focal genetic manipulation of ionic channels.[2–5] In these studies, adenovirus was systematically used as the gene delivery system. Although viruses have shown a remarkable efficacy, concerns about immunogenicity, virus-mediated random integration, recombination with wild-type viruses, the size limitation for the recombinant genome, and high production costs have stimulated efforts to develop alternative carriers.[6–8] Among those, poloxamine nanospheres are highly efficient in transfecting the heart muscle *in vivo*.[9,10]

In the present study, we used this nonviral gene delivery system to generate ventricular biological pacemakers in a pathological model, *i.e.*, mice in complete atrioventricular block (CAVB). CAVB was obtained by radiofrequency-mediated ablation of the atrioventricular (AV) node. On the basis of previous studies,[1–3] we chose to overexpress focally HCN2, one of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels known to generate the pacemaker current, I_f. Among the four HCN isoforms, HCN2 presents the advantage of combining fast activation kinetics and strong response to cAMP (for review, see ref. 11). Therefore, HCN2 was expressed either alone or in association with the β_2-adrenoceptor. Overexpression of β_2-adrenergic receptor (ADRB2) *per se* has also been shown to generate biological pacemakers in mouse and pig right atrium.[12,13] One limitation of this approach is that it does not provide new pacemaker channels but rather modulates the activity of the few pacemaker channels already present and to the extent that they are responsive to adrenergic input. Our results provide proof of concept that nonviral gene transfer produces functional cardiac biological pacemakers. These biological pacemakers are regulated by β-adrenergic input and improve life expectancy of CAVB mice.

RESULTS

Engineering biological pacemakers

Two different strategies were evaluated to generate biological pacemakers: (i) injection of pcDNA3-Hcn2 plasmid alone to produce HCN2 pacemaker channels in the myocardium, and (ii) co-injection of pcDNA3-Hcn2 (75% of 28 µg/10 µl) with pcDNA3-Adrb2 plasmid encoding β_2-adrenoceptors (25%), all combined with tetronic 304 vector. After injection of pcDNA3-Hcn2 plasmid alone (n = 5), ventricular escape rhythms were not significantly faster

The first two authors contributed equally to this work.

Correspondence: *Flavien Charpentier, INSERM UMR915, CNRS ERL3147, l'institut du thorax, UFR de Médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex, France.*

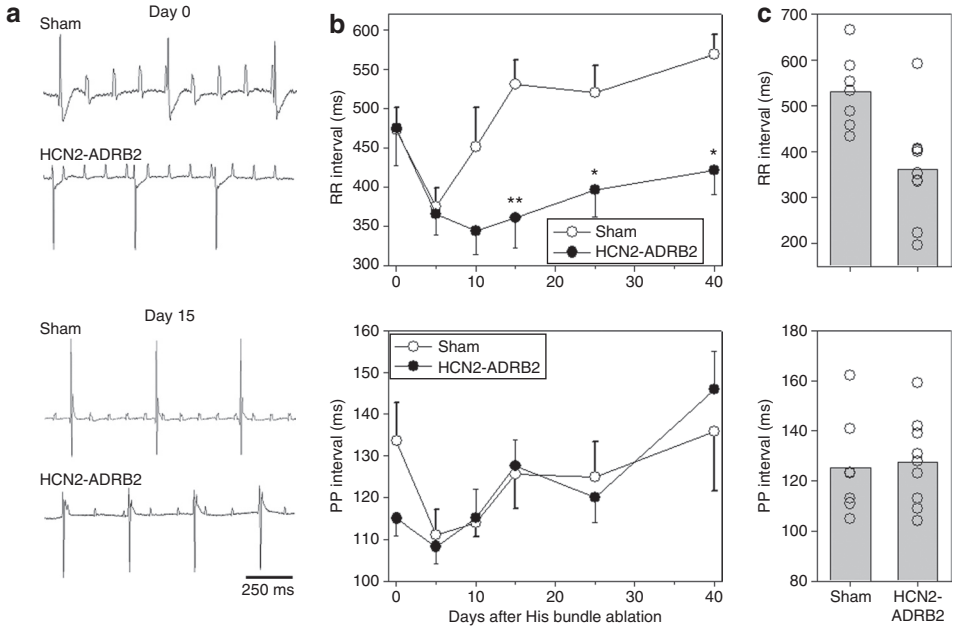

Figure 1 Long-term ECG follow-up of sham and HCN2-ADRB2 mice after complete atrioventricular block (CAVB) induction. (**a**) Representative lead 1 ECG recordings obtained under anesthesia in a sham mouse and a HCN2-ADRB2 mouse on the day of His bundle ablation (Day 0) and 15 days later (Day 15; 20 days after plasmid injection). Both mice are in CAVB. (**b**) Forty-days follow-up of the RR interval (top panel) and PP interval (bottom) of sham ($n = 7$) and HCN2-ADRB2 ($n = 9$) mice after His bundle ablation (day 0). *,**$P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, versus corresponding value in sham mice. (**c**) Mean (bars) and individual (empty circles) values of RR and PP interval in sham and HCN2-ADRB2 mice at Day 15.

Table 1 ECG parameters of sham ($n = 7$) and HCN2-ADRB2 ($n = 9$) mice

	Sham					HCN2-ADRB2				
	PP (ms)	RR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	PQ (ms)	PP (ms)	RR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	PQ (ms)
Before AVB	163 ± 31	163 ± 31	12 ± 1	64 ± 11	36 ± 3	153 ± 10	153 ± 10	11 ± 1	74 ± 5	31 ± 2
D0	133 ± 9	472 ± 28	15 ± 1	134 ± 15	—	115 ± 4	475 ± 47	16 ± 1	100 ± 11	—
D5	111 ± 6	375 ± 24	12 ± 1	133 ± 6	—	108 ± 4	366 ± 26	13 ± 1	141 ± 5	—
D15	125 ± 8	531 ± 30	15 ± 1	165 ± 15	—	128 ± 6	361 ± 38**	18 ± 1*	145 ± 8	—
D40	136 ± 14	569 ± 25	15 ± 1	168 ± 15	—	146 ± 9	422 ± 32*	15 ± 1	176 ± 18	—

Data are mean ± SEM.
AVB, atrioventricular block; D0, D5, D15, and D40, a few minutes, 5 days, 15 days, and 40 days after induction of atrioventricular block, respectively; PP, PP interval; PQ, PQ interval; QRS, QRS complex duration; QT, QT interval.
*$P < 0.05$ versus sham mice and **$P < 0.01$ versus sham mice.

than in sham mice ($n = 7$), despite a maximum increase of 18%, 15 days after CAVB (not significant versus sham mice). Sham mice correspond to mice injected with a noncoding plasmid. Based on these results, this strategy was discontinued in the profit of the second one.

Figure 1a shows representative electrocardiography (ECG) recordings obtained in a sham mouse and in a mouse injected with pcDNA3-Hcn2 and pcDNA3-Adrb2 plasmids (HCN2-ADRB2 mouse) a few minutes after His bundle ablation (Day 0) and 15 days later. In this example, the ventricular escape rhythm at day 0 was moderately faster in the HCN2-ADRB2 mouse (RR interval was 487 ms) that in the sham mouse (RR = 567 ms). The difference was larger at day 15. **Figure 1b** shows the evolution over a 40-day period of mean RR interval in sham ($n = 7$) and HCN2-ADRB2 mice ($n = 9$). His bundle ablation induced large decreases in rate which were similar in both HCN2-ADRB2 and sham mice: RR values increased from 163 ± 31 ms to 472 ± 28 ms in sham mice and from 153 ± 10 ms to 475 ± 47 ms in HCN2-ADRB2 mice (see **Table 1**). The idioventricular rhythms had QRS duration and QRS axis not different from that in sinus rhythm suggesting that the escape foci were located immediately downstream to the His bundle block. Five days later, ventricular escape rhythms were faster than at day 0 in both groups of mice, with no difference between groups for both rate and QRS axis. After this 5-day period, RR interval progressively increased in sham mice whereas it remained stable in HCN2-ADRB2 mice to reach at day 15, and later, values significantly shorter by 124–170 ms that those in sham mice. As shown in **Figure 1c**, one mouse from the HCN2-ADRB2 group clearly exhibited RR intervals much longer than the other mice. Our hypothesis is that this mouse was not successfully transfected. Indeed, in a preliminary series of experiments using chloramphenicol acetyl transferase as a reporter gene, we observed that injections in 3 of 27 hearts (11%) failed to produce significant chloramphenicol acetyl transferase expression

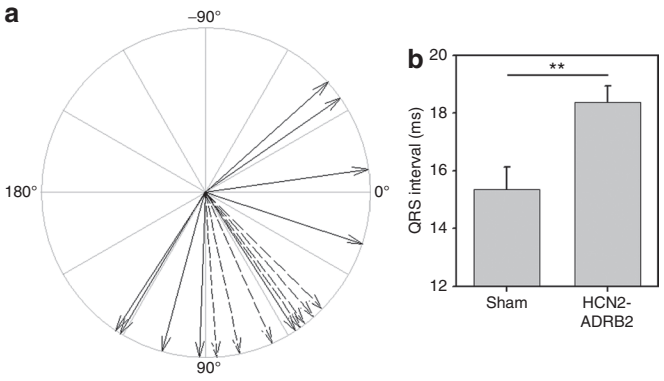

Figure 2 Characteristics of the QRS complex in sham (n = 7) and HCN2-ADRB2 (n = 9) mice at day 15 after His bundle ablation. (**a**) Individual QRS axes of sham (dotted arrows) and HCN2-ADRB2 (solid arrows) mice. (**b**) Mean (bars) values of QRS interval in sham and HCN2-ADRB2 mice at day 15. **P < 0.01 versus corresponding value in sham mice.

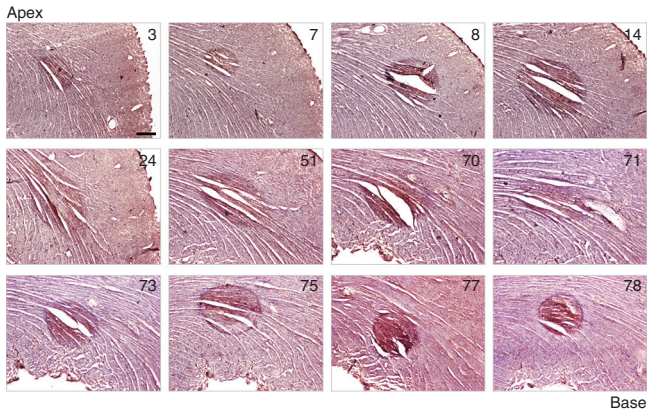

Figure 3 Immunostaining of GFP-HCN2 fusion protein in 12 representative 8-µm tissue sections of a mouse left ventricular free wall (from apex to base) injected with plasmids encoding GFP-HCN2 and ADRB2 31 days after CAVB (36 days after injection). Focally transgene expression in the left ventricular free wall is indicated by dark brown coloration. In this heart, 88 sections showed immunostaining. Section numbers are indicated in the upper right part of the photomicrographs. The scale bar in the bottom right section, which represents 200 µm, applies for all sections.

and were thus unsuccessful. One explanation would be that these injections were performed in the left ventricular lumen rather than in the ventricular myocardium. **Figure 1b** also illustrates the parallel evolution of the PP interval in the same mice. The PP interval, like the RR interval, shortened between day 0 and day 5 and then prolonged until day 40 similarly in both the sham and HCN2-ADRB2 groups. We interpret variations in PP interval as a marker of the sympathetic tone. Other ECG parameters in sham and HCN2-ADRB2 mice are provided in **Table 1**.

As shown in **Figure 2**, HCN2-ADRB2 mice were characterized at day 15 by abnormal QRS axes as measured in surface ECG recordings. QRS axes of sham mice clustered in the left inferior quadrant, with a median value of 75 ± 6. In contrast, the QRS axis of HCN2-ADRB2 mice was much more dispersed suggesting abnormal activation sequence of the ventricles. Only one of nine HCN2-ADRB2 mice had a normal axis. QRS interval was also significantly larger in HCN2-ADRB2 mice than in sham mice (**Table 1**). These data further support the conclusion that in HCN2-ADRB2 mice the engineered biological pacemakers were active to overdrive the idioventricular rhythm and were not located in the interventricular septum.

To verify that our engineered biological pacemakers resulted from expression of HCN2, a group of mice were injected with a mix of pcDNA3-Adrb2 and pCE-GFP-Hcn2 (encoding GFP-tagged HCN2) plasmids and killed at different times after CAVB induction for immunohistochemical studies. Fifteen days after CAVB induction, ventricular escape rhythms in GFP-HCN2-ADRB2 mice (RR = 417 ± 60 ms; n = 9) were similar to those in HCN2-ADRB2 mice (RR = 366 ± 26 ms; n = 9; not significant). **Figure 3** shows an example of immunostaining of GFP-tagged HCN2 channels, 31 days after His bundle ablation (36 days after injection). GFP-HCN2 channel was focally expressed in the region of gene administration, in the left ventricular free wall, as a local ovoid consisting of 88 sections of 8 µm. Given the dimension of the widest area, we estimated the ovoid volume to be about 182 cm^3. Supporting the information by Limana *et al.*[14] about volume and number of mononucleated, binucleated, and trinucleated myocytes in the left ventricle of wild-type mice, we calculated a mean myocyte volume of 24 μm^3.

Given that myocytes constitute only 30% of cardiac cells but occupy 85% of the myocardium, we evaluated the number of transfected myocytes to be >6,500. Immunostaining of GFP-HCN2 channel was also observed at days 10 and 24 after AV block. Two of three hearts showed positive staining at days 30–36 after injection. In contrast, no signal was detected in sham mice (two different hearts were examined). At day 40, one of three showed positive staining.

Engineered biological pacemakers increase survival of mice in chronic AV block

In an attempt to identify functional benefits resulting from induction of the biological pacemaker in mice in complete AV block, we monitored arrhythmias from day 0 to day 3 using telemetry. In control animals, complete AV block led to spontaneous bursts of polymorphic ventricular tachycardia strongly resembling torsades-de-pointes occurring in six of nine mice before day 1 and in most cases before 12 hours after ablation (not illustrated). Spontaneous episodes of ventricular arrhythmias were also seen in sham mice or in HCN2-ADRB2 mice with no differences in their severity and daily rate of occurrence. We also measured, at day 5 after ablation, the expression of molecular markers for hypertrophy including brain natriuretic peptide, skeletal α-actin, and SERCA2 but found no difference between the sham and the HCN2-ADRB2 groups (data not shown). Obviously, induction of a biological pacemaker provided no functional benefits before day 5.

Inversely, induction of a biological pacemaker reduced long-term mortality. In the mouse, chronic AV block associated to a high mortality rate starting 2–3 months after ablation. Postmortem examination showed signs of heart failure with dilated hearts (**Figure 4a**). Heart weight at the time of death in sham mice was 408 ± 17 mg with a heart/body weight ratio of 11.1 ± 0.5 (n = 5). In comparison, control mice in sinus rate had a mean heart weight of 144 ± 2 mg and a heart/body weight ratio of 4.7 ± 0.1 (n = 9; P < 0.001 versus sham for both parameters). As shown in **Figure 4b**, the time of death in HCN2-ADRB2 mice was delayed

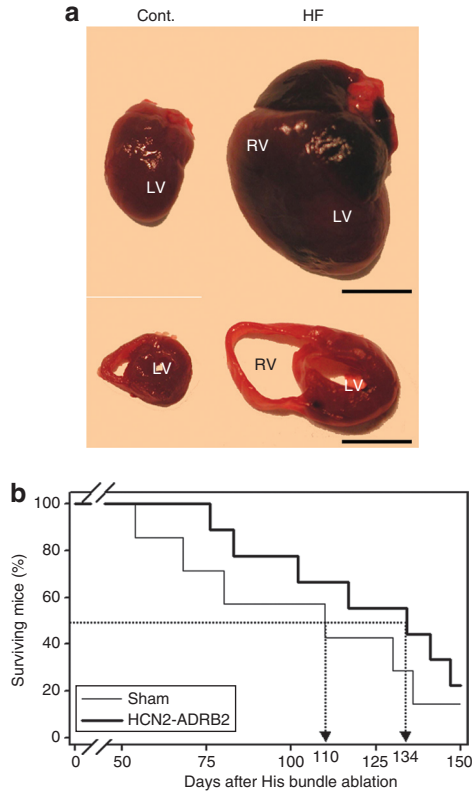

Figure 4 HCN2-ADRB2 delays heart failure–induced mortality. (**a**) Representative examples of hearts (top picture) isolated from a mouse in CAVB for 2 months (HF; right) and from an age-matched control mouse (Cont.; left). Bottom pictures show transversal ventricular sections of the same hearts. Scales are in mm. (**b**) Evolution of the survival rate (*y*-axis, in %) of sham ($n = 7$) and HCN2-ADRB2 ($n = 9$) mice as a function of time after His bundle ablation over a 150-day period (*x*-axis).

as compared to sham mice. Indeed, median survival was prolonged by more than 3 weeks in HCN2-ADRB2 mice (134 days versus 110 days in sham group). At the time of death, postmortem examination of HCN2-ADRB2 mice also showed dilated hearts with mean heart weights and heart/body weight ratios of 381 ± 20 mg and 10.9 ± 0.6, respectively ($n = 5$). As shown in **Table 1**, cardiac disease in both groups of mice was associated to prolonged QT interval.

β-Adrenergic regulation of engineered biological pacemakers

To investigate whether the engineered pacemaker was regulated by β-adrenergic input, we investigated under anesthesia the effects of IP injection of the β-adrenergic agonist isoproterenol at a dose of 40 µg/kg. This dose was chosen based on previous studies in mice showing a 20–25% decrease in PP interval. As shown in **Figure 5**, ventricular escape rhythms were more responsive to isoproterenol in HCN2-ADRB2 mice, with RR interval decreasing by about 38%, than in sham mice in which the RR interval decreased by only 22%. In contrast, sinus rhythms (PP interval; left panel of **Figure 5c**) were regulated similarly in both groups. Thus, the biological pacemaker was more sensitive to isoproterenol stimulation than the idioventricular rhythm in sham mice or the sinus node automaticity in either sham or HCN2-ADRB2 mice.

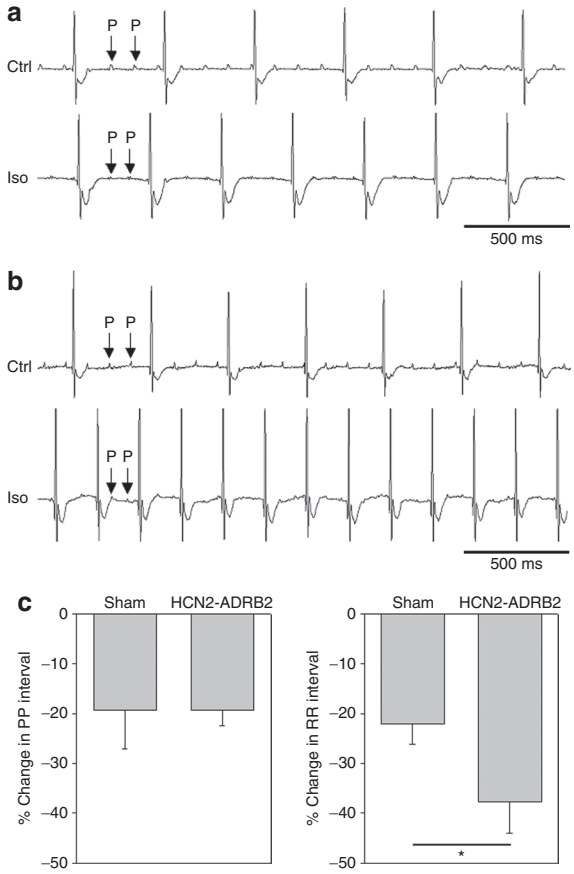

Figure 5 Effects of isoproterenol (40 µg/kg) on ventricular escape rhythms after His bundle ablation. (**a**) and (**b**) Representative lead 1 ECG recordings before and 10–15 min after IP injection of isoproterenol in a (**a**) sham mouse and a (**b**) HCN2-ADRB2 mouse. (**c**) Bar graphs showing the percentage of isoproterenol-induced change of PP (left) and RR (right) intervals (*y*-axis) in sham ($n = 6$) and HCN2-ADRB2 ($n = 8$) mice. *$P < 0.05$ versus sham.

DISCUSSION

Previous studies have provided the proof of concept regarding the feasibility of creating biological pacemakers with appropriate cardiac gene delivery.[1–5] However, these studies used adenovirus as a vector, *i.e.*, a gene delivery system that is most unlikely to undergo clinical evaluation in competition with electronic pacemaker devices. Indeed, viral vectors, which have largely proven their remarkable efficacy (see ref. 15 for recent review), have also raised major concerns with viral-induced immune reactions and the risk associated with replication-competent viruses. These obstacles have dramatically hampered their clinical use. The situation is entirely different with nonviral vectors and the clinical development of a gene therapy not requiring virus infection is not unrealistic. In this study, we have demonstrated that local nonviral cardiac gene delivery can generate long-lasting biological pacemakers and improve life expectancy in an animal model in complete AV block. We also demonstrated that biological pacemakers engineered by a dual gene therapy approach are regulated by β-adrenergic input. Our approach is based on our previous finding that poly(ethyleneoxide)-poly(propyleneoxide)-poly(ethyleneoxide) and poloxamine block copolymers efficiently

transduce skeletal and cardiac muscle *in vivo* provided that these DNA–vector mixes are directly injected into the muscle.[9] The fact that the intramuscular injection leads to very localized transfection is most appropriate to the objective of generating automatic foci. Moreover, a major advantage of nonviral vectors is that they allow co-transfection of multiple genes. As shown in this study, this might be useful for either regulating the generated pacemakers or adjusting their firing rates. We believe that our data provide a major step forward for clinical investigation of biological pacemakers although we realize that further ladders need to be cleared before first administration in human is warranted.

Although the beating rate of our engineered pacemakers is well adapted to the physiology of large animals, it obviously remains too slow for the mouse. Ten days after His bundle ablation, the rate of ventricular escape rhythms in HCN2-ADRB2 mice was about 30% more rapid than the rate of the idioventricular rhythm in sham mice. The difference in rate reached 59% at day 15 before decreasing to 35–41% (in dogs,[3] adenoviral engineered pacemakers increase the rate by about 30%. Yet, this was much lower that the normal sinus rate. However, the gain in rate was sufficient to improve the survival of HCN2-ADRB2 mice. CAVB in mouse induces ventricular hypertrophy that degenerates into heart failure. The disease is associated with a high rate of deaths after 2 months in CAVB. This is much later than in the rabbit model of CAVB. In contrast to mice, rabbits in CAVB mostly die suddenly within 38 days after His bundle ablation because of severe ventricular arrhythmias.[16] Similar to mice, dogs in chronic AV block exhibit a low incidence of sudden death (10%).[17] However in contrast to mice, the relatively high frequency of their escape rhythms leads to a compensated biventricular hypertrophy and prevents occurrence of heart failure.[18] Although HCN2-ADRB2 mice survive 3 weeks longer in average than sham mice, they ultimately die from heart failure. In both groups of mice, the cardiac disease is associated with electrical remodeling, *i.e.*, prolonged repolarization, as also observed in rabbits and dogs.[16,18,19] This shows that the gain in rate produced by the biological pacemaker is still too low to prevent progression of heart failure. Alternatively, abnormal activation of the ventricles most likely counterbalances the positive impact of the gain in rate.[20] Future investigations in larger animals will be useful to determine the best position of engineered biological pacemakers for optimal gain in rate and normal activation of the ventricles.

In the primary cardiac pacemaker, *i.e.*, the sinoatrial node, HCN channels are key components of sympathetic regulation of heart rate.[21] Indeed, elevation of intracellular cAMP levels in response to sympathetic input shifts the voltage dependence of the pacemaker current I_f in the positive direction resulting in increased inward current and faster diastolic depolarization.[22] Our hypothesis was that ventricular pacemakers obtained by co-transfecting encoding HCN2 and the β_2-adrenoceptor could be more sensitive to β-adrenergic stimulation. This hypothesis was confirmed by our experiments. This is an important finding because one of our initial objectives was to generate pacemakers that can respond to changes in emotion or physical exercise more efficiently than electronic pacemakers.

Our results suggest that the presence of ADRB2 is necessary to stimulate and therefore optimize the biological pacemaker induced by HCN2. In dogs, HCN2 was sufficient to generate biological pacemakers when overexpressed in atrium or in His bundle.[2,3] In contrast, there is no demonstration of its efficiency in ventricular myocardium. In atrium and His bundles, the mass of nontransfected tissue is not large enough to electrotonically antagonize the HCN2-induced automatic activity. Moreover, a spontaneous diastolic slope already characterizes His bundles. In contrast, in ventricular myocardium, the large mass of nontransfected well-coupled tissue can antagonize the emergence of pacemaker foci.

Preliminary experiments with chloramphenicol acetyl transferase expression (data not shown) had suggested that maximum levels of transgene expression were reached within 5 days. As a consequence, we decided to block the AV conduction 5 days after injecting *Hcn2* and *Adrb2*. To our surprise, it took at least 5 more days for the engineered pacemaker rhythm to emerge and overdrive the idioventricular rhythm. Different hypotheses can be evoked. First, it might take longer to obtain a sufficiently high level of HCN2 and ADRB2 expression at the membrane to generate enough pacemaker current for depolarizing the myocytes in diastole. Alternatively, HCN2 and ADRB2 expression might induce a progressive cellular remodeling that participates to the genesis of automatic activity. Finally, increased β-adrenergic tone might be necessary for the pacemaker to emerge. Examination of the PP interval curves as shown in **Figure 1b** suggests that the adrenergic tone increases with time after His ablation, reaching a maximum at day 5 after ablation. This adaptive mechanism helps maintaining cardiac performance in the short term, but is ultimately damaging to the myocardium.[23] A similar time course is also seen with the idioventricular rhythm in sham mice. In HCN2-ADRB2 mice, the idioventricular rhythm hampered the biological pacemaker between day 0 and day 5. After day 5, both sinus and idioventricular rhythms decelerate, a phenomenon that might be related to the well-described β_1-adrenoceptor downregulation and desensitization under sustained β-adrenergic input.[23] In addition, progressive cardiac remodeling could also lead to a decrease in intrinsic rate of the natural secondary pacemakers. In HCN2-ADRB2 mice, the engineered pacemaker overdrove the idioventricular rhythm probably because of β_2-adrenoceptor co-expression, less vulnerable to β-adrenoceptor downregulation and desensitization.

Our study suggests that cardiac transgene expression using poloxamines as the gene delivery system could last for long periods. To our knowledge the longest expression of biological pacemakers reported so far with adenovirus as the gene delivery system is 14 days.[24] In our experimental conditions, transgene expression appears to be at least as long as 45 days. Actually it might be underestimated because GFP-tagged HCN2 might be recognized as a foreign protein leading to transcriptional downregulation of the plasmid.[25,26] The situation may be most probably entirely different when HCN2 is not tagged, because it is a mouse isoform. In the mouse skeletal muscle, we have recently observed that long-lasting (>9 months) gene expression can be obtained with the same nonviral gene delivery system.[27]

Limitations and future directions

Injecting the transgenes 5 days before His bundle ablation might appear as a study limitation. Our choice was based on a previous observation that postsurgical mortality was high particularly during the first 24 hours. In the present study, of the 69 mice with successful induction of AV block, 26 (38%) died within 5 days

(19 during the first 24 hours), without any difference between the groups. We thought that a second surgical procedure for gene transfer would further increase the mortality.

Given the fact that mouse cardiac electrical activity differs markedly from humans, our engineered biological pacemakers obviously need further evaluations in larger mammals such as dogs or sheep. Whether the engineered biological pacemaker will lead to the same firing rate in larger mammals as in the mouse or inversely to lower firing rates will be addressed by these developments. In addition, larger animals will be useful for developing tools and procedures for gene delivery in humans. We also want to ensure that our engineered biological pacemaker could express itself in the atrium, an issue that cannot be solved in the mouse.

Further molecular developments include the evaluation of different promoters either cardiac specific and/or inducible, and investigation of the efficacy of mutated or engineered HCN channels[4,5,24,28] or other channels involved in natural cardiac pacemaker activity.[29] Among the many important issues remaining to be considered before biological pacemakers are administrated to humans, the duration of their efficacy is an essential point. The present study shows that HCN2 channels injected with nonviral vector in mouse heart are expressed at least as long as 45 days. To our knowledge, no exogenous HCN expression longer that 14 days has been reported so far.[28] Longer-term follow-up of the engineered biological pacemaker activity is needed once the most adequate promoter will be chosen.

MATERIALS AND METHODS

The study conformed to the institutional guidelines for animal use in research. Experiments were performed with adult male CD1 mice purchased from Charles River Laboratories, France.

Plasmid DNA, poloxamine, and formulation. Plasmids pcDNA3-Hcn2 (a gift from A. Ludwig, Institut für Pharmakologie und Toxicologie, München, Germany), pCE-GFP-Hcn2 (a gift from Richard B. Robinson, Center for Molecular Therapeutics, Columbia University, New York), and pcDNA3-Adrb2 contained the entire coding sequences of mouse genes encoding hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channel Hcn2 and β_2-adrenoceptor, controlled by the human cytomegalovirus promoter. A pcDNA3 plasmid containing no expression cassette was used for sham mice. All plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* using Endo-Free plasmid purification columns (Qiagen, Hilden, Germany).

Tetronic 304, a poloxamine, was provided by BASF (Mount Olive, NJ). Stock solutions (20% wt/vol) were prepared in water. Formulations of DNA with tetronic 304 were prepared by mixing equal volumes of tetronic 304 stock solution in water and plasmid DNA solution at the desired concentration in 150 mmol/l NaCl.

Gene delivery. Gene delivery was performed 5 days before induction of CAVB. Mice were anesthetized by IP injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgène 500; Mérial, Lyon, France) and xylazine (20 mg/kg, Rompun 2%; Bayer Pharma, Puteaux, France). Postsurgical analgesia was obtained by subcutaneous injection of 1 mg/kg of nalbuphine (Nubin; CERB, Baugy, France). Mice were ventilated at 140 cycles/min with a 200-µl tidal volume (Minivent Type 845; Hugo Sachs Electronik, March-Hugstetten, Germany). Body temperature was maintained at 37 °C with a retro-controlled warming pad (Harvard Apparatus, Holliston, MS). After left thoracotomy in the fifth intercostal space, each mouse received a single injection of 10 µl of tetronic 304-DNA solution in 150 mmol/l NaCl containing 38 µg of DNA (5% of tetronic 304) intramuscularly in the lower third (apical region) of the left ventricular free wall. Injections were performed with a 10-µl Hamilton syringe and a 30-gauge needle.

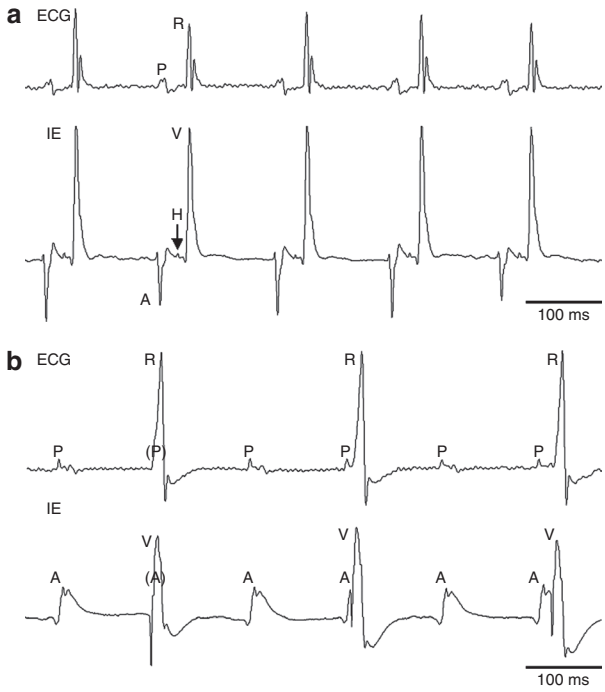

Figure 6 Representative surface lead 1 ECG and right intracardiac electrogram (IE) before and after His bundle ablation. (**a**) Before ablation. (**b**) After ablation, note the complete dissociation between atrial rhythm (at the sinus rate) and ventricular escape rhythm. P, P wave; R, QRS complex; A, atrial activity; H, His bundle activity; V, ventricular activity; (P) and (A), P wave and atrial electrogram masked by ventricular activity (fusion complexes).

Induction of AV block. AV node ablation was performed 5 days after gene delivery. **Figure 6** shows an example of induction of complete (third degree) AV block. After anesthesia and analgesia with IP injection of etomidate (25 mg/kg; Janssen-Cilag, Berchem, Belgium) and nalbuphine (3 µg/kg), mice were heparinized (5 units IV, Héparine Choay; Sanofi-Aventis, Paris, France). After local anesthesia with a subcutaneous injection of lidocaine 1%, a custom-made Biosense 2F quadripolar catheter (Biosense Webster, Diamond Bar, CA) was introduced into the right atrium and ventricle through the right internal jugular vein. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, Paris, France) for monitoring and later analysis and measurement. After detection of the His bundle activity (**Figure 6**), radiofrequency ablation was performed using Osypka Hat 200S pulse generator (Osypka, Rheinfelden-Herten, Germany). Pulses were delivered during 15 s at a power of 2 W.

ECG. Six-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585) 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 IP injection of etomidate (15 mg/kg). Body temperature was maintained at 37 °C using a retro-controlled heating pad (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Criteria used for measuring RR, PQ, QRS, and QT intervals, as well as P-wave duration can be found elsewhere.[30]

Five mice (three with an engineered biological pacemaker and two sham) were implanted with a telemetric device at the time of plasmid injection. A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20, Data Sciences International,

St Paul, MN) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax. Telemetric ECG signals were computer recorded with a telemetry receiver and an analog-digital conversion data acquisition system for analysis with ECG auto 1.5.11.26 (EMKA Technologies) software.

Immunohistochemical detection of GFP-tagged HCN2. Mice were killed by cervical dislocation under anesthesia with etomidate (25 mg/kg). The hearts were dissected, rapidly rinsed, dried, and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Tissues were embedded in Tissue-Tek (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and cut into 8-μm sections. The sections were examined for GFP-HCN2 expression by immunohistochemistry with rabbit GFP antibody (Millipore, Billerica, MA). Antibodies were detected using biotinylated goat antirabbit immunoglobulins (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), followed by streptavidin-peroxydase. Before the application of GFP antibody, sections were incubated with H_2O_2 to inhibit endogenous peroxydase and with fetal calf serum to saturate nonspecific fixation sites. Antibodies were detected using diaminobenzidine substrate chromogen system (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and nuclei were visualized using Harris hematoxylin coloration.

Statistical analysis. All data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed with Student *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.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fondation de l'Avenir pour la Recherche Thérapeutique (F.C.) and the Association Française contre les Myopathies (F.C., D.E., J.P.). We thank Clothilde Gourden (In-Cell-Art), Agnès Hivonnait and Marie-Jo Louérat (INSERM UMR915) for expert technical assistance and Isabelle Baró for her helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Miake, J, Marbán, E and Nuss, HB (2002). Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* **419**: 132–133.
2. Qu, J, Plotnikov, AN, Danilo, P Jr, Shlapakova, I, Cohen, IS, Robinson, RB *et al.* (2003). Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* **107**: 1106–1109.
3. Plotnikov, AN, Sosunov, EA, Qu, J, Shlapakova, IN, Anyukhovsky, EP, Liu, L *et al.* (2004). Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* **109**: 506–512.
4. Tse, HF, Xue, T, Lau, CP, Siu, CW, Wang, K, Zhang, QY *et al.* (2006). Bioartificial sinus node constructed via *in vivo* gene transfer of an engineered pacemaker HCN Channel reduces the dependence on electronic pacemaker in a sick-sinus syndrome model. *Circulation* **114**: 1000–1011.
5. Kashiwakura, Y, Cho, HC, Barth, AS, Azene, E and Marbán, E (2006). Gene transfer of a synthetic pacemaker channel into the heart: a novel strategy for biological pacing. *Circulation* **114**: 1682–1686.
6. Chen, WC and Huang, L (2005). Non-viral vector as vaccine carrier. *Adv Genet* **54**: 315–337.
7. Jooss, K and Chirmule, N (2003). Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther* **10**: 955–963.
8. Buckley, RH (2002). Gene therapy for SCID—a complication after remarkable progress. *Lancet* **360**: 1185–1186.
9. Pitard, B, Pollard, H, Agbulut, O, Lambert, O, Vilquin, JT, Cherel, Y *et al.* (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther* **13**: 1767–1775.
10. Pitard, B, Bello-Roufai, M, Lambert, O, Richard, P, Desigaux, L, Fernandes, S *et al.* (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res* **32**: e159.
11. Kaupp, UB and Seifert, R (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* **63**: 235–257.
12. Edelberg, JM, Aird, WC and Rosenberg, RD (1998). Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest* **101**: 337–343.
13. Edelberg, JM, Huang, DT, Josephson, ME and Rosenberg, RD (2001). Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart* **86**: 559–562.
14. Limana, F, Urbanek, K, Chimenti, S, Quaini, F, Leri, A, Kajstura, J *et al.* (2002). Bcl-2 overexpression promotes myocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6257–6262.
15. Williams, ML and Koch, WJ (2004). Viral-based myocardial gene therapy approaches to alter cardiac function. *Annu Rev Physiol* **66**: 49–75.
16. Tsuji, Y, Opthof, T, Yasui, K, Inden, Y, Takemura, H, Niwa, N *et al.* (2002). Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation* **106**: 2012–2018.
17. van Opstal, JM, Verduyn, SC, Leunissen, HD, de Groot, SH, Wellens, HJ, Vos, MA (2001). Electrophysiological parameters indicative of sudden cardiac death in the dog with chronic complete AV-block. *Cardiovasc Res* **50**: 354–361.
18. Volders, PG, Sipido, KR, Vos, MA, Kulcsár, A, Verduyn, SC and Wellens, HJ (1998). Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. *Circulation* **98**: 1136–1147.
19. Vos, MA, de Groot, SH, Verduyn, SC, van der Zande, J, Leunissen, HD, Cleutjens, JP *et al.* (1998). 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.
20. Sweeney, MO and Prinzen, FW (2006). A new paradigm for physiologic ventricular pacing. *J Am Coll Cardiol* **47**: 282–288.
21. Irisawa, H, Brown, HF and Giles, W (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* **73**: 197–227.
22. Ludwig, A, Zong, X, Jeglitsch, M, Hofmann, F and Biel, M (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**: 587–591.
23. Lohse, MJ, Engelhardt, S and Eschenhagen, T (2003). What is the role of β-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**: 896–906.
24. Macri, V and Accili, EA (2004). Structural elements of instantaneous and slow gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* **279**: 16832–16846.
25. Herweijer, H, Zhang, G, Subbotin, VM, Budker, V, Williams, P and Wolff, JA (2001). Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med* **3**: 280–291.
26. Latta-Mahieu, M, Rolland, M, Caillet, C, Wang, M, Kennel, P, Mahfouz, I *et al.* (2002). Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum Gene Ther* **13**: 1611–1620.
27. Richard-Fiardo, P, Payen, E, Chèvre, R, Zuber, J, Letrou-Bonneval, E, Beuzard, Y *et al.* (2008). Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. *Hum Gene Ther* **19**: 331–342.
28. Bucchi, A, Plotnikov, AN, Shlapakova, I, Danilo, P Jr, Kryukova, Y, Qu, J *et al.* (2006). Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. *Circulation* **114**: 992–999.
29. Couette, B, Marger, L, Nargeot, J and Mangoni, ME (2006). Physiological and pharmacological insights into the role of ionic channels in cardiac pacemaker activity. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **6**: 169–190.
30. Royer, A, van Veen, TA, Le Bouter, S, Marionneau, C, Griol-Charhbili, V, Léoni, AL *et al.* (2005). Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* **111**: 1738–1746.

Discussion complémentaire et perspectives

Le nœud SA est un modèle idéal dans la recherche de la création d'un pacemaker biologique. L'objectif n'est pas une reproduction essentielle de la structure et la fonction du nœud SA, mais de reproduire suffisamment sa fonction naturelle afin de la mimer efficacement pour un traitement.

Le fait que l'injection intracardiaque du complexe transgène-tétronic 304 conduise à l'expression focalisée du pacemaker induit est approprié à notre objectif de générer un foyer unique de pacemaker. Or, dans les études précédemment réalisées grâce à des adénovirus, la vérification de l'expression du transgène par mesure électrophysiologique ou immunomarquage sur myocytes isolés, ne permettait pas de confirmer l'existence d'une unique zone infectée. Étant donné le pouvoir de diffusion et de réplication des vecteurs viraux, il est possible d'envisager l'existence de multiples zones cellulaires infectées. L'existence de multiples foyers automatiques est susceptible d'engendrer des troubles du rythme du fait de la compétition entre ces différents pacemakers. De plus, un autre avantage des vecteurs non-viraux est leur capacité à co-transfecter de multiples plasmides d'expression, étant donné l'absence de limite de taille, contrairement à ce qui est réalisable avec les virus. Preuve en est la transfection de cellules musculaires squelettiques par le plasmide contenant l'ADNc de la dystrophine d'une taille importante de 16,1 Kb (Richard et al., 2005). Cette particularité des vecteurs non-viraux nous offre ainsi l'opportunité de co-transfecter plusieurs gènes pour optimiser ou réguler le pacemaker biologique.

Toujours dans la perspective d'améliorer la fonctionnalité du pacemaker biologique, se pose aussi la question du site d'injection le plus approprié. Pour espérer stimuler efficacement l'ensemble du cœur et de manière synchronisée, il semble préférable de créer le pacemaker biologique au sein même des voies de conduction et ce le plus haut possible, c'est-à-dire dans le tronc commun du faisceau de His lors du BAVc ou au sein même des oreillettes pour une dysfonction sinusale. Notons tout de même, que malgré l'injection de notre système dans le ventricule gauche de souris en dehors des voies de conduction, le gain d'activité obtenu est supérieur à ceux obtenus dans l'oreillette gauche ou la branche gauche du faisceau de His chez le chien (25% plus rapide que les animaux contrôles) (Qu et coll., 2003 ; Plotnikov et coll., 2004).

Bien que la notion d'un pacemaker biologique en remplacement d'un stimulateur électronique soit attractive, il faut reconnaître que, malgré leurs limites, les stimulateurs cardiaques électroniques en général fonctionnent bien et ont résisté à l'épreuve du temps depuis plus de 50 ans. Cependant, chez les patients qui ont désespérément besoin d'un stimulateur cardiaque électronique, mais qui présentent des contre-indications d'implantation, le pacemaker biologique peut être idéalement adapté pour la gestion de la bradycardie pacemaker-dépendante compliquée par une infection bactérienne de l'appareil, dans lequel la contre-indication aux sondes métal/plastique ré-infectables conduit à un avantage unique pour la stimulation biologique à court terme.

Le transfert génique pour créer un pacemaker biologique cardiaque dans des modèles expérimentaux animaux apparaît donc faisable, du moins à court terme (plusieurs semaines). Cependant, ces approches méritent d'être validées dans des modèles animaux à long terme avant d'envisager des essais cliniques.

Notre étude permet au moins d'offrir une alternative au troisième défaut majeur des études réalisées jusqu'à maintenant, qui est l'utilisation de vecteurs viraux avec tous les risques que cela comporte : réponse inflammatoire et risque carcinogène. De plus, nous avons pu vérifier que les transgènes vectorisés par le vecteur non-viral pouvaient s'exprimer plus d'un mois. Dans le muscle squelettique, une expression stable de l'érythropoïétine pendant plusieurs mois a été obtenue avec ce type de vecteur (Richard-Fiardo et al., 2008). Ce délai d'expression est à rapprocher des limites temporelles d'expression des transgènes lors d'infections adénovirales.

Plusieurs études ont récemment démontré que le pacemaker biologique pouvait réduire la dépendance au stimulateur électronique, suggérant que la combinaison d'un pacemaker biologique et d'un stimulateur électronique est envisageable (Bucchi et al., 2006). Ce tandem pourrait permettre des battements cardiaques plus efficaces et sécurisés, et surtout d'économiser la batterie et donc d'allonger le délai entre deux interventions, avec les risques que cela comporte.

Une étude récente chez le chien a montré des réponses chronotropiques au cours des changements d'émotion du pacemaker biologique (Shlapakova et al., 2010). Cette étude confirme qu'un pacemaker biologique est capable de réagir à des stimuli naturels

pour susciter l'excitation appropriée des réponses chronotropiques, un avantage potentiel par rapport aux stimulateurs électroniques.

En conclusion, la thérapie génique en utilisant des vecteurs synthétiques est une nouvelle stratégie dans la recherche thérapeutique en rythmologie, cependant, il faut optimiser l'efficacité du transgène ainsi que la durée du traitement, l'idéal étant une injection pour un traitement curatif. Le pacemaker biologique est dans sa phase initiale de conception, une situation comparable au développement du pacemaker électronique à la fin des années 50.

III. Rôle de la sous-unité Cav3.1 (I_{CaT}) dans la régulation du pacemaker ventriculaire et la survenue de Torsades de Pointes chez la souris.

Les courants calciques de type T sont préférentiellement présents dans le système de conduction cardiaque des adultes. La gamme d'activation de I_{CaT} chevauche le potentiel de pacemaker, ce qui suggère que I_{CaT} puisse jouer un rôle important dans la dépolarisation diastolique et contribuer à l'automatisme (Hagiwara et al., 1988). La fréquence cardiaque est différente selon les espèces de mammifères : elle est très rapide chez les petits animaux comme la souris, le rat et le cobaye, mais elle est plus lente chez les gros animaux y compris l'Homme et le porc (Ono et al., 2005). I_{CaT} peut, en partie, être responsable de la différence de fréquence cardiaque pour diverses espèces de mammifères. En effet, la densité du courant I_{CaT} est importante chez les petits animaux, mais diminue en même temps que la taille de l'animal augmente (souris > cobaye > lapin > porc (Ono et al., 2005)). De façon intéressante, I_{CaT} est négligeable dans les cellules du nœud SA de porc. Jusqu'à aujourd'hui, aucun courant I_{CaT} n'a été mis en évidence dans les cellules du nœud SA humain. Récemment toutefois, Verkerk et al. (2009) a décrit un grand courant entrant dans les cellules du nœud SA de l'Homme. Bien que l'origine de ce courant n'ait pas été analysée en détail, cette étude montre que ce dernier possède des caractéristiques communes aux courants I_{Na} et I_{CaT}.

Il n'existe pas de bloqueur spécifique de I_{CaT}. Les bloqueurs actuels comme le mibefradil, l'efonidipine ou le kurtoxin affectent aussi le courant de type L ainsi que les courants sodiques et potassiques. Par conséquent, l'utilisation des modèles de souris KO pour les canaux générant I_{CaT} (Cav3.1 et Cav3.2) est un choix évident afin d'explorer de façon précise leur rôle dans la physiologie et la physiopathologie cardiaque. En utilisant un modèle murin invalidé pour la sous-unité Cav3.1 (Cav3.1-/-), une étude antérieure (Mangoni et al, 2006) a montré que Cav3.1 est la sous-unité majeure de I_{CaT} dans le cœur et joue un rôle important dans la fonction du nœud SA ainsi que dans la conduction auriculo-ventriculaire. Cependant, au niveau ventriculaire, le rôle de Cav3.1 dans le système de Purkinje reste encore incertain.

Afin d'éclairer la contribution de Cav3.1 dans la régulation de l'automatisme ventriculaire ainsi que dans la survenue des arythmies, nous avons créé un modèle de

souris Cav3.1-/- en BAVc. Les résultats de ce projet ont été présentés sous forme d'affiche lors du congrès de l'AHA en 2009.

Résultats:

L'enregistrement de l'ECG de surface à l'état de base a montré un allongement significatif de la conduction auriculo-ventriculaire (l'intervalle PQ = 43 $\pm$ *2 ms*) et une légère réduction de la fréquence cardiaque (l'intervalle RR = 149 $\pm$ *3 ms*) chez les souris Cav3.1-/- par rapport aux souris sauvages Cav3.1+/+ (PQ = 38 $\pm$ *1 ms ;* RR = 132 $\pm$ *2 ms, p<0.05*). Les autres paramètres de l'ECG de surface comme l'onde P, le complexe QRS, l'intervalle QT n'ont pas changé chez les souris Cav3.1-/-. Ces résultats sont similaires aux résultats de l'étude de Mangoni et al., en 2006.

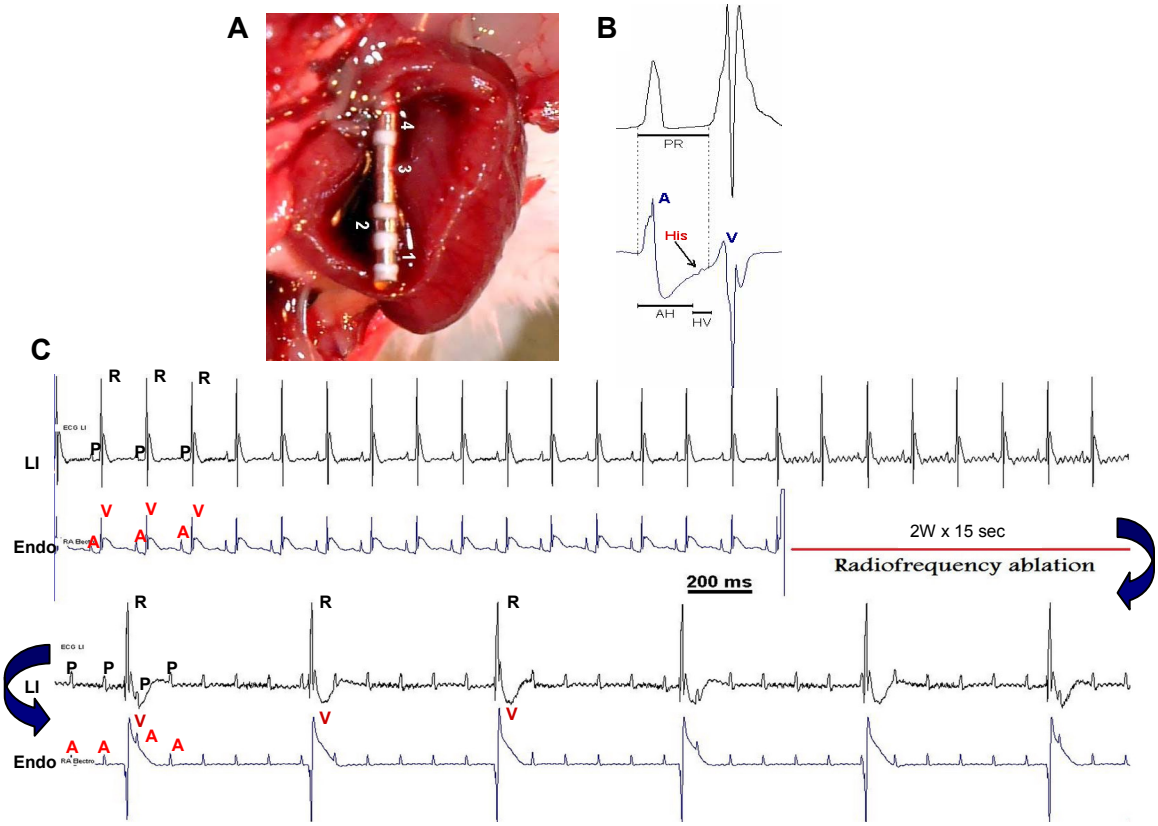

***Figure 32** : A : Visualisation du cathéter d'ablation dans le ventricule droit. Les deux électrodes 1,2 sont utilisées pour la stimulation, les deux autres 3 et 4 sont utilisées pour enregistrer le signal du faisceau de His et pour l'ablation par radiofréquence. **B** : Le signal biphasique du faisceau de His (enregistrement endocavitaire). **C** : L'électrocardiogramme de*

surface (LI) et endocavitaire (Endo.) avant (rythme sinusal) et après l'ablation du faisceau de His par la radiofréquence (bloc de conduction auriculo-ventriculaire complet). Le rythme auriculaire est toujours plus rapide que la fréquence du rythme ventriculaire avec une dissociation totale entre les ondes P et les complexes QRS.

Après l'introduction de la sonde dans le ventricule droit de souris, le signal du faisceau de His a pu être détecté dans 80% des souris. La morphologie de ce signal est biphasique (figure 32B). Les paramètres de la conduction intracardiaque des souris sauvages montrent que l'intervalle AH (28.3 *± 1.4* ms*,* du nœud SA jusqu'au His) est plus long que l'intervalle HV (9.6 *± 1.6* ms*,* du His jusqu'au myocarde ventriculaire). Les souris Cav3.1-/- présentent une prolongation de l'intervalle AH (33.5 *± 1.1* ms*, p<0.05*) alors que l'intervalle HV est similaire (10.2 *± 1.0* ms) à celui des souris sauvages.

L'application des courants de radiofréquence au niveau du faisceau de His (intensité 2 W – pendant 15 secondes) détruit ce tissu. Nous obtenons un BAVc juste après l'ablation avec une dissociation AV complète (figure 32C). Le rythme d'échappement ventriculaire est d'environ 150 à 200 bpm (RR est aux alentours de 300 à 400 ms). Les oreillettes continuent de battre au rythme sinusal dont la fréquence est plus rapide (environ 500 bpm). Le taux de réussite est environ de 80%.

L'analyse histologique montre que la lésion cardiaque est située entre l'oreillette droite et le septum interventriculaire, en avant du septum membraneux où passe le nœud atrio-ventriculaire et le faisceau de His.

Après 4 semaines en BAVc, les quatre cavités du cœur sont élargies par rapport à l'état de base (figure 33A). Le rapport de « poids du cœur/poids du corps » est significativement augmenté chez les deux groupes de souris par rapport à l'état de base. Cependant, il n'y pas de différence pour cet index de l'hypertrophie cardiaque entre les souris Cav3.1-/- et les souris sauvages Cav3.1+/+ (figure 33B).

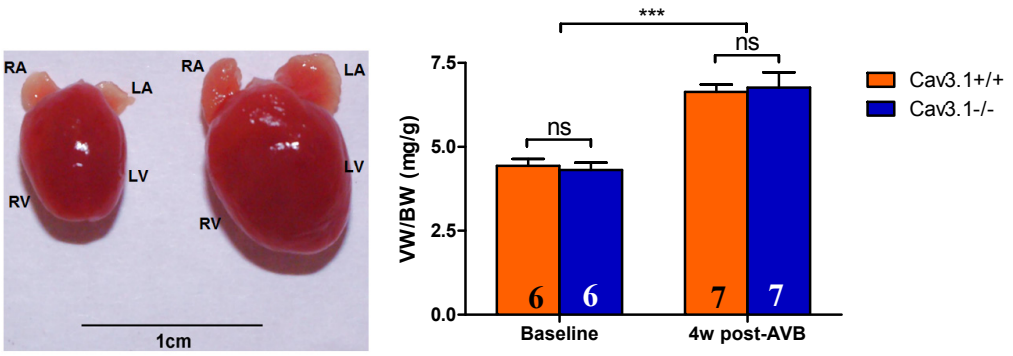

Figure 33 **:** ***A*** *: Cœur d'une souris contrôle (à gauche) et après 4 semaines en BAVc (à droite), caractérisée par un processus de remodelage hypertrophique important.* ***B*** *: Le rapport " poids du cœur/poids du corps" est augmenté chez les souris en BAVc depuis 4 semaines par rapport à l'état de base (*** $p<0.001$*), il n'y a pas de différence entre les souris Cav3.1-/- et les souris sauvages.*

Juste après l'ablation du nœud AV, les souris Cav3.1-/- possèdent un rythme d'échappement idioventriculaire plus lent que les souris sauvages (RR = 650 ± *75* ms chez les souris Cav3.1-/- vs 331 ± *30* ms chez les souris sauvages, $p<0.001$). Le rythme d'échappement ventriculaire est ralenti progressivement dans les quatre heures après l'ablation chez toutes les souris, cependant, l'intervalle RR est encore plus long chez les souris Cav3.1-/- par rapport aux souris sauvages (1298 ± *62* ms chez les Cav3.1-/- vs 806 ± *38* ms chez les souris sauvages, $p<0.001$).

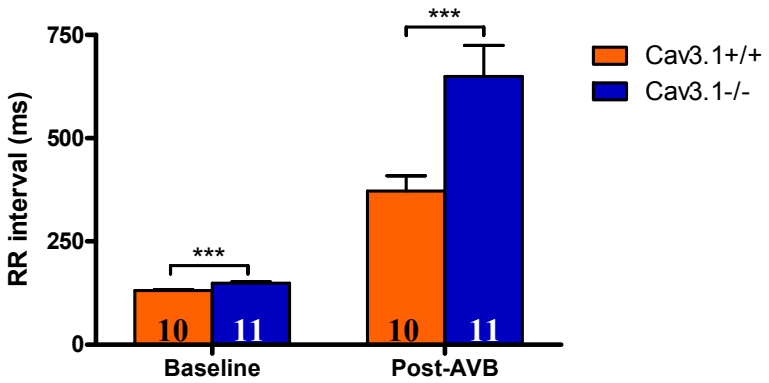

Figure 34 **:** *Intervalle RR à l'état de base et après l'ablation du faisceau de His. Les souris Cav3.1-/- possèdent des valeurs de l'intervalle RR significativement prolongées par rapport aux souris sauvages dans les deux états (*** $p<0.001$*).*

Les périodes réfractaires effectives ventriculaires sont similaires entre les deux groupes de souris.

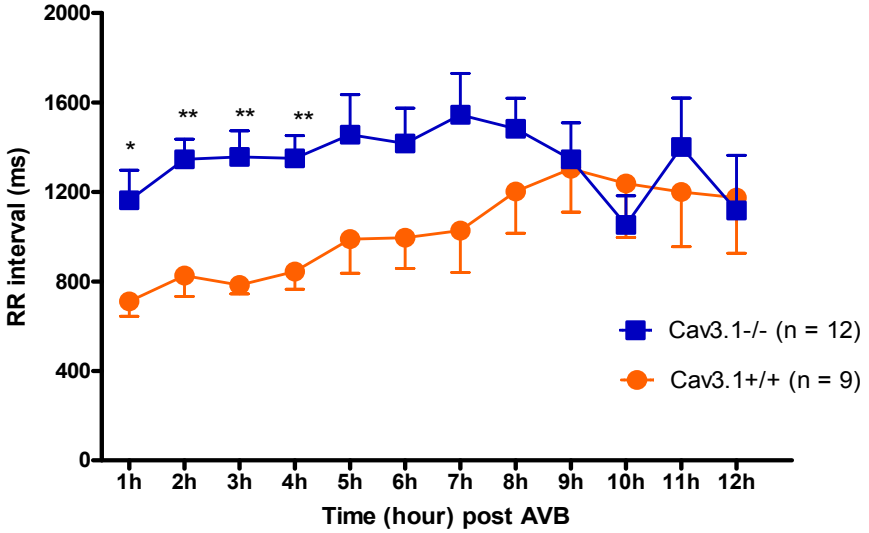

Figure 35 *: Variation de l'intervalle RR en fonction du temps durant les 12 h après l'ablation du faisceau de His. Dans les quatre premières heures, le rythme idioventriculaire des souris Cav3.1-/- est plus lent que celui des souris sauvages, et accélère progressivement pour atteindre une valeur de l'intervalle RR similaire aux souris sauvages à partir de 8 h après BAVc (* p<0.05 ;** p<0.01).*

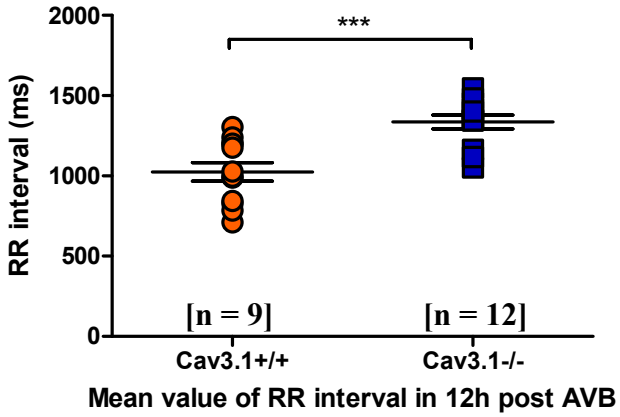

Figure 36 *: Valeurs moyennes de l'intervalle RR durant les 12 h post BAVc. Le rythme d'échappement idioventriculaire chez les souris Cav3.1-/- est plus lent que chez les souris sauvages (RR = 1336 ± 43 ms vs 1025 ± 58 ms, p<0.001).*

Les Torsades de Pointes (TdP) induites par la bradycardie sévère post BAVc sont plus fréquentes chez les souris Cav3.1-/- (9/12 ou 75%) que chez les souris sauvages (6/16 ou 38%, $p<0.05$), pendant les 24 h après BAVc. Le taux de mortalité est plus élevé chez les souris Cav3.1-/- dans les 24 h post BAVc par rapport aux souris sauvages (14/22 ou 63% versus 7/16 ou 44% chez les souris sauvages).

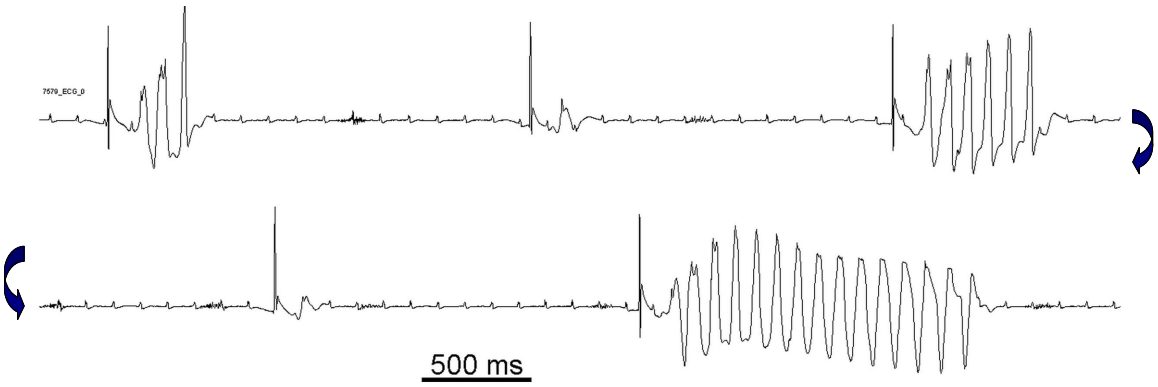

Figure 37 **:** *Exemples représentatifs d'arythmies ventriculaires enregistrées en télémétrie chez une souris Cav3.1-/- dans les 24 h post BAVc. L'enregistrement du bas montre une torsade de pointes qui s'arrête spontanément. Aucune évolution vers la fibrillation ventriculaire n'a été observée.*

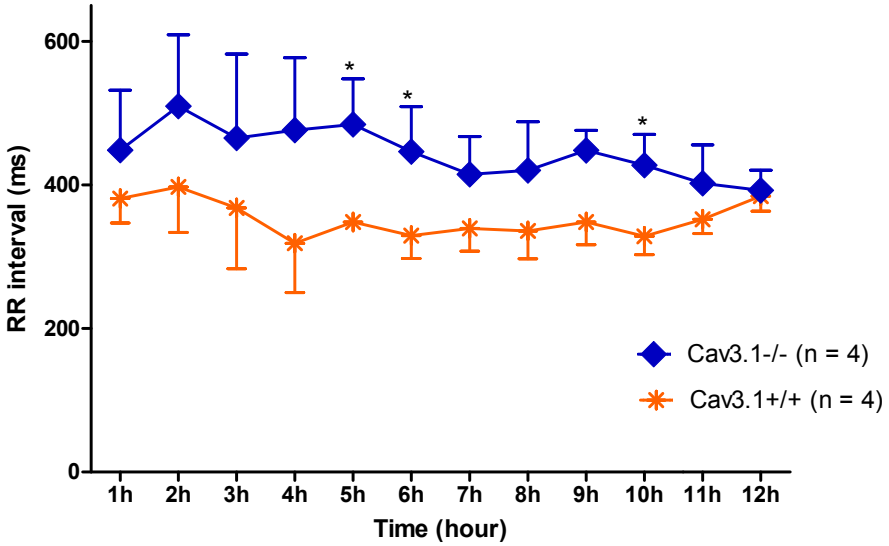

Figure 38 *: La variation de l'intervalle RR en fonction du temps pendant 12h après 4 semaines en BAVc. Le rythme d'échappement ventriculaire reste encore plus lent chez les souris Cav3.1-/- (* $p<0.05$).*

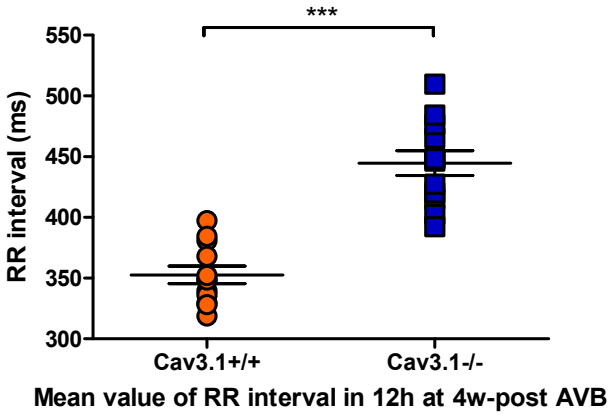

Figure 39 *: Valeurs moyennes de l'intervalle RR sur 12 h à 4 semaines post BAVc. Le rythme d'échappement idioventriculaire chez les souris Cav3.1-/- reste plus lent que celui des souris sauvages (RR = 508 ± 17 ms vs 358 ± 10 ms, respectivement, $p<0.001$, n = 4 pour chaque groupe).*

L'isoprénaline est administrée à 2 et 4 semaines post BAVc (200 ng/g, IP) afin de tester la réponse de changement du rythme d'échappement ventriculaire à la stimulation β-adrénergique. L'ECG de surface est enregistré à l'état de base et 3 minutes après l'injection d'isoprénaline (la température corporelle est toujours à 37°C). La valeur de l'intervalle RR avant l'injection d'isoprénaline est plus lente chez les souris Cav3.1-/-. A deux semaines post BAVc, après injection d'isoprénaline, l'intervalle RR est similaire entre les deux groupes. Cependant, à quatre semaines post BAVc, l'intervalle RR chez les souris Cav3.1-/- reste plus long que chez les souris sauvages après injection d'isoprénaline.

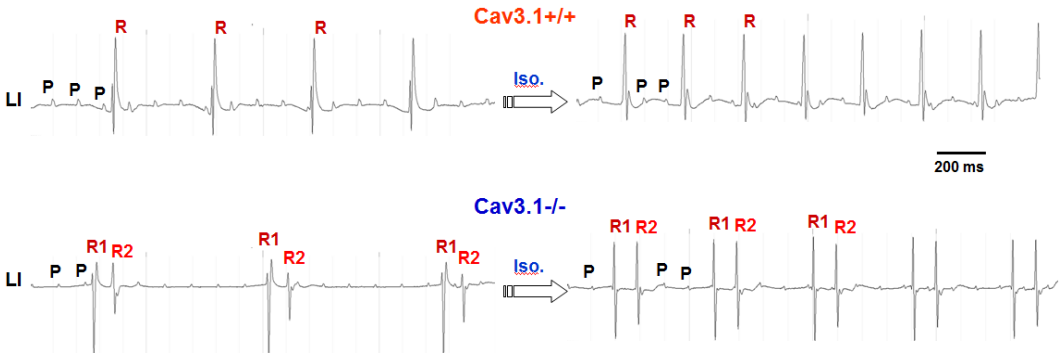

Figure 40 **:** *Illustration de l'ECG de surface avant et après injection d'isoprénaline (200 ng/g, IP) chez les souris Cav3.1-/- (en bas) par rapport aux souris sauvages (en haut) à deux semaines post BAVc.*

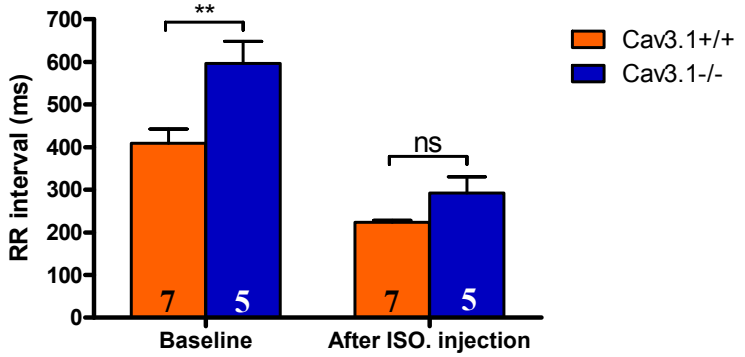

Figure 41 **:** *L'intervalle RR à deux semaines post BAVc. Avant l'injection d'isoprénaline, l'intervalle RR est plus long chez les souris Cav3.1-/- mais cette différente est abolie après l'injection d'isoprénaline (200 ng/g, IP), ** p<0.01.*

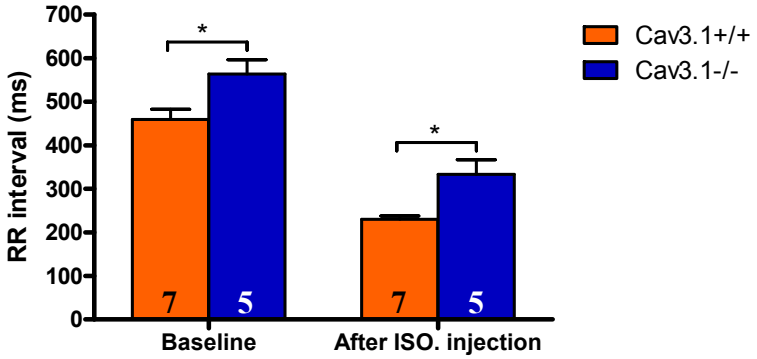

***Figure 42** : L'intervalle RR à quatre semaines post BAVc. Avant l'injection d'isoprénaline, l'intervalle RR est plus long chez les souris Cav3.1-/-, cette différente persiste encore après l'injection d'isoprénaline (200 ng/g, IP), * p<0.05.*

A quatre semaines post BAVc, les tachycardies ventriculaires sont encore plus fréquentes chez les souris Cav3.1-/- par rapport aux souris sauvages, et leur durée est plus longue (figure 44).

Une échocardiographie a été réalisée à l'état de base et à 4 semaines post BAVc. Le taux de raccourcissement et la fraction d'éjection sont similaires entre les 2 groupes de souris à l'état basal mais ces valeurs sont augmentées significativement chez les souris sauvages à 4 semaines post BAVc (figure 45). En revanche, le rapport poids du cœur / poids du corps est significativement augmenté dans les deux types de souris (figure 33).

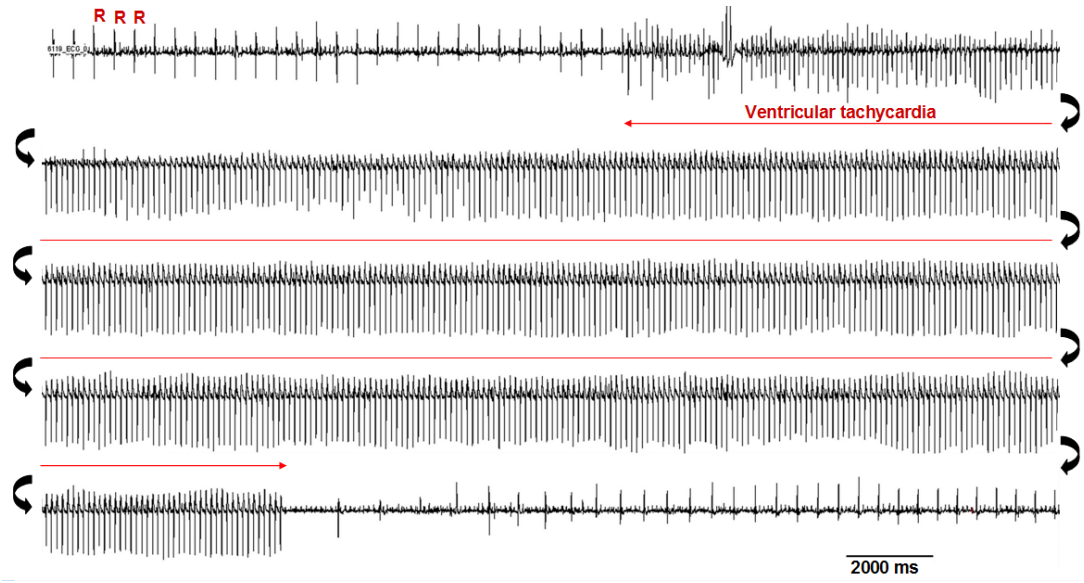

***Figure 43** : Exemple représentatif de tachycardie ventriculaire (TV) chez une souris Cav3.1-/- à 4 semaines post BAVc. La TV s'arrête spontanément.*

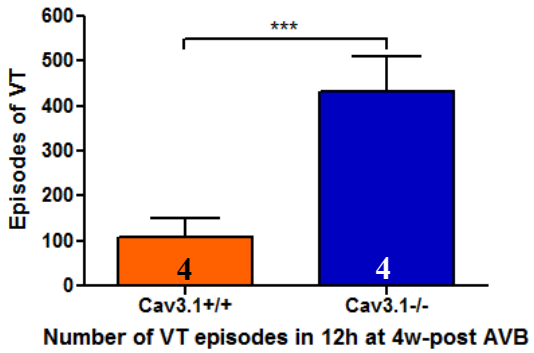

Figure 44 **:** *Nombre moyen par souris d'épisodes de TV à 4 semaines post BAVc, les souris Cav3.1-/- présentent plus fréquemment de la TV par rapport aux souris sauvages (*** p<0.001).*

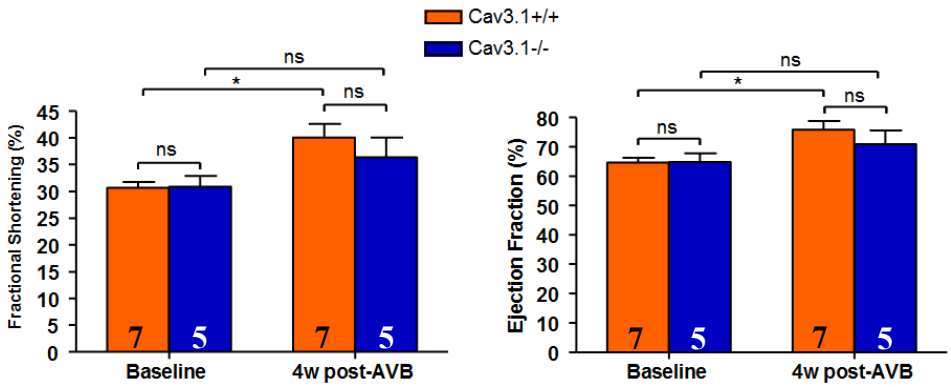

Figure 45 **:** *Le taux de raccourcissement et la fraction d'éjection du VG à l'état de base et à 4 semaines post BAVc (*p<0.05).*

Discussion, conclusion et perspectives

Bien que le mibéfradil ne soit pas un bloqueur spécifique de I_{CaT} (il bloque aussi I_{CaL} et les autres courants), il peut supprimer sélectivement la phase ultérieure de la dépolarisation diastolique des cellules de type pacemaker d'une manière dépendante de la concentration sans effets sur l'amplitude et la durée du potentiel d'action (Protas et al., 2000). Une étude clinique a aussi démontré que l'administration orale de mibéfradil aboutit à un ralentissement du rythme sinusal (Madle et al., 2001).

L'expression de l'ARNm de la sous-unité Cav3.1 dans les cellules du nœud SA est 30 fois plus élevée que celle mesurée dans les cellules auriculaires. Quant à la sous-unité Cav3.2, elle est présente également, mais seulement en quantité modérée (Bohn et al., 2000). En outre, les souris Cav3.1-/- présentent un ralentissement du rythme sinusal et

de la conduction auriculo-ventriculaire (Mangoni et al., 2006). Huser et al. (2000) ont démontré que, dans les cellules de pacemaker de chat, l'influx de Ca^{2+} entré à travers les canaux calciques de type T peut déclencher une libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, qui à son tour pourra activer un mode avant de l'échangeur NCX afin de dépolariser des cellules de type pacemaker. Donc, dans les modèles animaux, I_{CaT} joue un rôle important dans la genèse de l'automatisme dans le nœud SA et le nœud AV (Mangoni et al., 2006).

Nos résultats montrent que l'absence de Cav3.1 favorise le développement des TdP dans un contexte de bradycardie sévère, lui-même favorisé par l'absence du canal. Notre étude suggère en effet que I_{CaT} participe à la création du rythme d'échappement dans les branches du faisceau de His et le système de His-Purkinje. De façon intéressante, les résultats de notre première étude (article 1, figure 4), montrent que l'expression de l'ARNm de Cav3.1 est diminuée dès 12 h post BAVc, au moment où la prévalence de survenue de TdP est la plus haute. A l'inverse, l'expression de l'ARNm de la sous-unité Cav1.3 de I_{CaL} est augmentée à 12 h post BAVc (figure 4, article 1). L'analyse de l'expression des ARNm chez la souris KO-Cav1.3 en BAVc est en cours de réalisation afin de finaliser l'étude. Le courant I_{CaT} des cellules du système de Purkinje de chien n'est pas affecté par la stimulation β adrénergique (Hirano et al., 1989; Maylie et al., 1995). Cependant, Zhang et al. (2002) ont montré que l'isoprénaline peut augmenter les courants I_{CaT} des cardiomyocytes ventriculaires de cobaye. L'injection d'isoprénaline à 2 semaines post BAVc a conduit à une accélération du rythme d'échappement ventriculaire chez toutes les souris mais de façon de plus importante chez les souris Cav3.1-/- puisque leur fréquence ventriculaire, après l'injection, devient similaire à celle des souris sauvages. Inversement, à 4 semaines, la différence de fréquence cardiaque persiste après l'injection d'isoprénaline. Ce résultat suggère qu'il existe un changement du remodelage électrique post BAVc (I_{CaT}, I_{CaL}, I_f…).

Au cours du BAVc, les oreillettes se contractent au rythme sinusal, alors que les ventricules se contractent à un rythme d'échappement de 2 à 5 fois plus lent. D'après la loi de Frank-Starling, les ventricules des souris post BAVc se contractent plus fortement qu'à l'état de base à cause d'une surcharge volumique. L'échocardiographie montre que le taux de raccourcissement est augmenté chez les souris sauvages à 4 semaines post

BAVc, mais cette valeur n'est pas significative chez les souris Cav3.1-/-. Cette différence peut être liée à l'altération de l'homéostasie calcique et du couplage excitation-contraction chez les souris Cav3.1-/-.

Cette étude suggère que la sous-unité Cav3.1 (I_{CaT}) joue un rôle important dans la genèse de l'automatisme ventriculaire ainsi que dans la régulation du rythme d'échappement idioventriculaire. Une perte de Cav3.1 augmente le risque d'arythmies telles que les torsades de pointes associées au BAVc, possiblement via un remodelage induit par la bradycardie plus sévère.

IV. Rôle de la sous-unité Cav3.1 (I_{CaT}) dans le remodelage cardiaque post-infarctus du myocarde (IDM)

Bien que le canal calcique de type L soit omniprésent et la source principale de Ca^{2+} dans le couplage excitation-contraction cardiaque ainsi que dans l'activité de pacemaker, le rôle fonctionnel des canaux calciques de type T est divers et dépend des espèces de mammifères, de la région du cœur, de l'âge et de diverses maladies cardiovasculaires. Il existe deux isoformes de canaux calciques de type T dans le cœur : Cav3.1 et Cav3.2. Ces deux isoformes sont exprimées fonctionnellement dans le cœur embryonnaire, mais leur expression est nettement réduite au cours du développement. Dans le cœur adulte, le canal calcique de type T est presque indétectable dans les myocytes ventriculaires. En revanche, il est très exprimé dans le système de conduction et joue un rôle dans la dépolarisation diastolique des cellules du nœud sinusal (Mangoni et al, 2006). Notre étude précédente (paragraphe III) suggère qu'il puisse aussi participer à la genèse de l'automatisme à l'étage ventriculaire.

Les canaux calcique de type T sont ré-exprimés dans les myocytes auriculaires et ventriculaires dans diverses conditions pathologiques telles que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque comme dans les modèles expérimentaux de coarctation aortique, d'infarctus du myocarde, et d'exposition chronique à l'endothéline-1, à l'angiotensine II ou à l'aldostérone (Vassort et al., 2006). I_{CaT} dans le ventricule hypertrophié de rat montre en général une sensibilité au Ni^{2+} relativement élevée, un trait caractéristique de la sous-unité Cav3.2. A l'inverse, la quantité d'ARNm de Cav3.2 est inchangée, tandis que l'expression de l'ARNm de Cav3.1 est augmentée. Yasui et al. (2005) ont rapporté que l'expression de l'ARNm de Cav3.1 est diminuée dans le cœur hypertrophié de souris après coarctation de l'aorte, tandis que l'expression de l'ARNm de Cav3.2 est comparable aux contrôles. En outre, une étude récente a constaté que, dans les cellules hypertrophiées d'oreillette droite de rats traité avec la monocrotaline, l'amplitude de I_{CaT} est nettement augmentée, bien que l'expression de Cav3.1 et Cav3.2 reste inchangée (Koyama et al., 2009). Les mécanismes par lesquels les canaux calcique de type T sont réexprimés ont été étudiés. L'angiotensine II exerce un effet hypertrophique sur les cardiomyocytes des rats, accompagnée d'une augmentation de I_{CaT} et de l'expression de l'ARNm de la sous-unité Cav3.1 (Ferron et al., 2003; Morishima et al., 2009). Ferron et al. (2003) suggèrent

que l'angiotensine II, via la voie du récepteur AT1/mitogène activé (MAP) kinase (MEK)-dépendante, est responsable de la réexpression de la sous-unité Cav3.1 (régulation de la transcription), et l'endothéline autocrine, par une voie de récepteur ET_A-activé MEK-indépendante, est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de Cav3.1.

Afin d'étudier le rôle de I_{CaT} à l'état de base ainsi qu'au cours du remodelage cardiaque post-IDM, nous avons choisi un modèle de souris KO-Cav3.1 en comparaison avec les souris sauvages. Cet article est actuellement soumis à publication.

Article 3: **Role of T-type calcium current subunits in cardiac remodeling probed with genetically engineered knockout mice**

Role of T-type calcium current subunits in cardiac remodeling probed with genetically engineered knockout mice

Khai Le Quang[1,2], Patrice Naud[1], Xiao Yan Qi[1], Francine Duval[1], Yan-Fen Shi[1], Marc-Antoine Gillis[1], Philippe Comtois[3], Jean-Claude Tardif[1], Danshi Li[4], Paul C. Levesque[4], Flavien Charpentier[5], and Stanley Nattel[1,2,6*]

[1]Research Center and Departments of Medicine, [2]Pharmacology and [3]Physiology, Université de Montréal and Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada; [4]Bristol-Myers-Squibb, Princeton, NJ, [5]Inserm UMR_S915, l'Institut du Thorax, F-44000 Nantes, France, and [6]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: T-type calcium current and post-MI remodeling

Word Count: 5538

*Corresponding author. 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8.

ABSTRACT Khai Le Quang, Patrice Naud, Xiao Yan Qi, Francine Duval, Yan-Fen Shi, Marc-Antoine Gillis, Philippe Comtois, Jean-Claude Tardif, Danshi Li, Paul C. Levesque, Flavien Charpentier, and Stanley Nattel. Role of T-type calcium current subunits in cardiac remodeling probed with genetically engineered knockout mice.

Aims - Previous studies suggested that T-type Ca^{2+}-current (I_{CaT})-blockers improve cardiac remodeling, but all available I_{CaT}-blockers have non-specific actions on other currents and/or functions. To clarify the role of I_{CaT} in cardiac remodeling, we studied mice with either of the principal cardiac I_{CaT} subunits (Cav3.1 or Cav3.2) knocked out.

Methods and Results - Adult male Cav3.1 or Cav3.2 knockout ($Cav3.1^{-/-}$, $Cav3.2^{-/-}$) and respective wild-type littermate-controls (WTs) were subjected to left-anterior descending coronary-artery ligation to create myocardial infarction (MI). Echocardiography and programmed electrical stimulation were performed at baseline and 4 weeks post-MI. At baseline, $Cav3.1^{-/-}$ mice had slowed heart rates and longer PR-intervals versus WT, but no other electrophysiological and no hemodynamic differences. $Cav3.2^{-/-}$ showed no differences versus WT. Contractile indices (left-ventricular fractional shortening and ejection fraction) decreased more post-MI in $Cav3.1^{-/-}$ mice than $Cav3.1^{+/+}$ (e.g. by 34.3%, 28.5% respectively for WT; 50.3%, 44.6% for $Cav3.1^{-/-}$, $P<0.05$ for each). $Cav3.1^{-/-}$ mice had increased ventricular tachycardia (VT)-inducibility post-MI (9/11, 82%) versus WT (3/10, 30%, $P<0.05$). $Cav3.2^{-/-}$ mice were not different in cardiac function or VT inducibility versus WT. Quantitative PCR showed that Cav3.1 is the major I_{CaT}-subunit and that no compensatory Cav3.2 upregulation occurs in $Cav3.1^{-/-}$ mice. $Cav3.1^{-/-}$ and $Cav3.2^{-/-}$ mice had no mRNA-expression for the knocked-out gene, at baseline or post-MI.

Conclusions - Our findings suggest that, contrary to suggestions from previous studies with (imperfectly selective) pharmacological agents having T-type Ca^{2+}-channel blocking actions, elimination of Cav3.1-expression leads to impaired cardiac function and enhanced arrhythmia vulnerability post-MI, whereas Cav3.2-elimination has no effect.

1. Introduction

There are 2 principle types of Ca^{2+}-channels in the heart, "long-lasting" L-type channels and "transient" T-type channels.[1,2] L-type Ca^{2+}-current (I_{CaL}) has well-understood roles in cardiac impulse initiation and propagation, arrhythmogenesis and contraction. The function of T-type Ca^{2+}-current (I_{CaT}) is less well-understood. T-type channels clearly participate in sinus-node pacemaker function and in atrioventricular-node conduction.[3] In addition, there is evidence for a deleterious role of I_{CaT} in cardiac remodeling and arrhythmogenesis.[1] I_{CaT} is strongly expressed in fetal hearts and its expression is greatly reduced in the mature heart; however, cardiac hypertrophy restores I_{CaT} expression to substantial levels.[4] Neonatal cardiomyocyte hypertrophy is induced by hyperglycemia, concomitant with enhanced I_{CaT} expression.[5] Suppression of I_{CaT} with mibefradil or nickel prevents cell-proliferation changes.[5]

The I_{CaT}-selective blocker mibefradil improves myocardial remodeling in a variety of paradigms. Mibefradil has been reported to suppress remodeling and improve hemodynamic function in a rat myocardial infarction (MI) model,[6] prevent exercise-induced myocardial stunning in dogs with partial coronary-artery occlusions,[7] and abolish atrial tachycardia-induced arrhythmogenic remodeling in dogs.[8] Comparative studies have shown greater efficacy of mibefradil versus I_{CaL}-selective inhibitors in post-MI functional and Ca^{2+}-handling preservation,[9] in preventing myocardial damage following acute ischemia and reperfusion in isolated hearts from normal rats[10] and from guinea pigs with acute renal failure,[11] and in preventing arrhythmogenic remodeling by chronic atrial tachycardia in dogs.[12] On the other hand, possible deleterious effects of mibefradil have been reported in post-MI remodeling[13] and on contractile function in hypertrophied hearts.[14] A recent study suggested that the I_{CaT}-blockers efonidipine and mibefradil prevent sudden death in mice with heart failure (HF), whereas the I_{CaL}-blocker nitrendipine does not.[15]

A major difficulty in establishing the functional role of T-type Ca^{2+}-channels has been the limited selectivity of pharmacological probes.[1,2] The establishment of the molecular identity of I_{CaT} α-subunits has permitted the development of genetically-engineered mice, allowing for clarification of the functional role of I_{CaT}. Mice with increased I_{CaT} due to Cav3.1-subunit overexpression have smaller increases in contractility and no enhanced sarcoplasmic-reticulum (SR) Ca^{2+}-load compared to mice with increased I_{CaL} due to overexpression of the L-type channel β-subunit.[16] Nakayama et al have shown that Cav3.1-overexpression abrogates, whereas Cav3.1-knockout enhances, overload-, isoproterenol- and exercise-induced cardiac hypertrophy by a nitric-oxide synthase (NOS)-dependent mechanism.[17] However, other workers demonstrated that pressure-overload hypertrophy is suppressed in Cav3.2-knockout mice (KO) and unaffected by Cav3.1-deletion.[18] Therefore, the role of I_{CaT} and of its respective subunits in adverse cardiac remodeling remains unclear. In the present study, we addressed this issue by assessing the effects of Cav3.1 and Cav3.2 knockout in mice subjected to acute MI, a highly clinically-relevant form of cardiac remodeling.

2. Methods

2.1 Cav3.1$^{-/-}$ and Cav3.2$^{-/-}$ mouse lines

Cav3.1 and Cav3.2 mouse lines were obtained in C57BL6/SV129RvEvBrd strains from Lexicon Genetics. Heterozygous mice were used for breeding and homozygous KO and wild-type (WT) littermates were used for comparison. Briefly, exon-1 for Cav3.1 or Cav3.2 was deleted and replaced by IRES-lacZ/MC1-Neo for selection in pKOS vectors. Embryonic stem (ES) cells were transfected with the KO insert and recombinant ES-cells were selected with the appropriate antibiotic. Recombinant ES-cells were then injected back into mouse embryos and mice missing the gene of interest were selected by polymerase chain reaction (PCR). Ear-clip samples were digested with proteinase-K at 50° C for 20 hours and genomic DNA was then purified with isopropanol precipitation

followed by 70%-ethanol washing. Genotyping after each breeding was performed with the following primers: Cav3.1: forward (5'-GGTTGTGTGAGGACACCTC), reverse (5'-GTTGAGCTGCGTGAAGCTC), yielding a 145-bp WT-product; forward (5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC), reverse (5'-CACATCTGTAGAGCATCCAG), generating 400-bp KO-product; Cav3.2: forward (5'-GGCTCTATGGCTTCTGAGGCG), reverse (5'-ACCTATGGCCTGTCCTGAGT) generating a 280-bp WT-product, forward (5'-TCCAGACACCAGCAGACTTG), reverse (5'-CCTCGTTCCAGAAGCTCTGA), generating 277-bp KO-product. PCR was performed with Taq Polymerase (Invitrogen): annealing temperature 54° C, PCR run for 35 cycles.

2.2 Animal handling

All experimental protocols were approved by the local Animal-Research Ethics committee and conducted according to the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Adult male KO and WT mice (30-35 weeks old at entry) were used in this study. The initial surgical procedure for MI-creation was performed under aseptic conditions. Mice were anesthetized with 2.5%-isoflurane via the endotracheal intubation used for continuous mechanical ventilation with parameters set according to a nomogram. A surface ECG (lead I) was recorded for monitoring and later off-line analysis. Body temperature was kept at 37° C with a homeothermic warming blanket. A 1.5-cm vertical left parasternal skin incision was then made 2 mm away from the left sternal border and the chest was opened at the 4th intercostal space. After removing the pericardial sac and slightly retracting the left auricle, the left-anterior descending artery coronary artery (LAD) was indentified and ligated 2 mm below the tip of the left auricle. Mice were treated with the long-acting narcotic analgesic drug buprenorphine (Temgesic, 500 IU/kg, IP) 20 minutes before LAD ligation.

2.3 Electrocardiogram and telemetry recording

At baseline and 4 weeks post-MI, mice were anesthetized for ECG recording with 2.5%-isoflurane. Body temperature was maintained at 37° C with a heating pad (Harvard Apparatus, USA). A surface ECG (lead I) was obtained with three 25-gauge subcutaneous electrodes and transmitted to a computer via an analog-digital converter (IOX v1.585, EMKA Technologies) for monitoring and later analysis with ECG-Auto 1.5.12.10 software (EMKA Technologies). Recordings were filtered between 0.5 and 500 Hz. Measurements were based on averages of 10 consecutive complexes. Standard criteria were used to measure RR, PR, QRS and QT intervals.[19] The QT interval was corrected for heart rate as follows: corrected QT interval (QTc) = $QT/(RR/100)^{1/2}$, with QT and RR, expressed in milliseconds (ms).[20]

To obtain 24-hour ECG recordings after LAD ligation in free-moving mice, mice were anesthetized 1 week before LAD ligation with 2.5%-isoflurane delivered via a ventilator. An abdominal incision was made 1.5 cm lateral to the midline to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20, Data Sciences International) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax (to obtain a bipolar chest ECG lead). Mice were housed in individual cages with free access to food and water and were exposed to 12-hour light/dark cycles (light, 6:00 AM to 6:00 PM) in a thermostatically controlled room. ECG signals were computer-recorded with the use of a telemetry receiver (RPC1, DSI International) and IOX 2.3 and ECG-Auto 2.4.0.30 (EMKA) systems were used for display and analysis. Heart rate values were determined from average RR intervals over 10 seconds.

2.4 Intracardiac recording and pacing

At baseline and 4 weeks after LAD ligation, mice were anesthetized with 2.5%-isoflurane. An octapolar electrophysiology catheter (1.2 F) designed for mouse electrophysiology (Biosense Inc) was

positioned in the right ventricle via the right internal jugular vein. Intracardiac electrograms were used as a guide for catheter positioning. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.11, EMKA) for monitoring and later analysis (ECG-Auto 2.1.4.15). Intracardiac electrograms were filtered between 0.5 and 500 Hz. Pacing was performed with a custom-built computer-based stimulator triggering a stimulus isolator (509 Stimulator, Grass Telefactor). Standard pacing protocols were used to determine electrophysiologic parameters as described elsewhere.[3] Refractory periods were determined with a 9-stimulus drive train (S1) at a cycle length of 100 ms followed by a 1.5×threshold-current 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 that failed to generate a propagated beat. Programmed single, double and triple extrastimuli were applied at a 100-ms drive cycle length. Burst pacing consisted of trains of 50 paced beats at a cycle length from 50 ms to 15 ms, with at least a 4-second interval between two successive trains (unless arrhythmias were induced). Ventricular tachycardia (VT) was defined as 10 or more successive spontaneous ventricular beats. Atrial fibrillation (AF) was defined as a rapid and irregular atrial rhythm with variable ventricular response, and was considered sustained if it lasted >1 seconds before termination.

2.5 Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed under 2.5%-isoflurane anesthesia before LAD ligation at baseline, and 4 weeks following myocardial infarction (MI), using an i13L (10-14 MHz) probe and a Vivid-7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). The left ventricular (LV) parasternal long axis view was used to measure the dimension (D) of the LV outflow tract (LVOT). LVOT cross-sectional area (CSALVOT) was calculated as $CSALVOT=\pi(D/2)^2$. The LV short-axis

view at the papillary-muscle level was recorded: LV areas at both cardiac end-diastole (EDA) and end-systole (ESA) were measured with the papillary muscle excluded, along with LV anterior wall (AW) and posterior wall (PW) thickness at end-diastole. LV fractional area change (FAC) was calculated as ((EDA-ESA)/EDA)×100%. LV M-mode images at this level were used to determine LV dimensions at end-diastole (LVDd) and end-systole (LVDs). LV fractional-shortening (FS) was calculated as ((LVDd–LVDs)/LVDd)×100%. The Teicholz method was employed to calculate LV volumes and LV ejection fraction (EF). An apical 5-chamber view was used to obtain the velocity-time integral of trans-LVOT flow (VTILVOT) with pulsed-wave Doppler proximal to the aortic valve. Heart rate (HR) was determined on a simultaneously recorded ECG. Stroke volume (SV) was calculated as SV=VTILVOT×CSALVOT, and cardiac output was calculated as CO=HR×SV. The average of three consecutive cardiac cycles was used for each measurement. Special care was taken to obtain similar imaging planes at baseline and follow-up studies. The operator was blinded to treatment assignment.

2.6 Hemodynamic indices

Hemodynamic indices were obtained following catheterization under 2.5%-isoflurane anesthesia. Body temperature was maintained at 37° C. A micro-tip Millar-type pressure-volume 1.2 F catheter (Scisense Inc, Canada) was inserted into the right carotid artery and advanced into the LV. Correction of the conductance was performed by injecting 5 µl 20%-NaCl into the left jugular vein. At baseline and 4 weeks post-MI, the mean blood pressure, the maximal (+dP/dt) and minimal (-dP/dt) first derivatives of LV pressure, the contractility index and the relaxation time were calculated with IOX v1.8.9.4 software (EMKA). After the hemodynamic measurements, mice were euthanized by cervical dislocation under 2.5%-isoflurane anesthesia, the heart was removed and washed in Ca^{2+}-free Tyrode solution. The transmural-MI scar was removed and weighed.

2.7 Taqman real-time quantitative polymerase chain reaction

The left atrium (LA) and LV were flash-frozen in liquid-N_2 for subsequent RNA isolation. Procedures for Taqman real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) followed previously described methods.[21] Total RNA was isolated using Trizol method (Invitrogen). Total RNA was then treated with DNase I (Sigma Chemicals) to prevent genomic DNA contamination. Lack of genomic DNA-contamination was confirmed by PCR. The quality of RNA was assessed with a bioanalyzer (Agilent 2100). Total RNA was reverse-transcribed with the High-capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed with TaqMan probes and primers from Applied Biosystems on the T-type calcium channel genes: Cav3.1 (Assay ID: Mm00486549_m1), Cav3.2 (Assay ID: Mm00445369_m1). The geometric mean of HPRT1 (Assay ID: Mm00446968_m1) and GAPDH (Assay ID: Mm99999915_g1) was used for normalization. Quantitative PCR reactions were performed with Taqman Gene Expression Master Mix kit (Applied Biosystems). Reactions were run on a Stratagene MX3000. Standard curves were generated for each set of primers over a 2-log range and the efficiencies were 100±5%. Relative gene-expression values were calculated by the $2^{-\Delta Ct}$ method.[21]

2.8 Data analysis

Data are expressed as mean±SEM. Unpaired *t*-tests were used to compare single non-repeated means from different groups and for multiple measures, ANOVA followed by Bonferroni-corrected t-tests. Fisher's exact test was used to analyze categorical variables. A two-tailed P-value<0.05 denoted statistically-significant differences.

3. Results

Detailed results in both groups for ECG, electrophysiological, echocardiographic, hemodynamic, and heart-weight analyses in all mice at baseline and 4 weeks post-MI are tabulated in Online Tables 1 and 2. Results of particular relevance are presented in figures and described below.

3.1 Electrocardiographic recordings, hypertrophic and infarct-size indices

RR (Figure 1A) and PR (Figure 1B) intervals were significantly increased in Cav3.1$^{-/-}$ mice compared to Cav3.1$^{+/+}$, both at baseline and 4 weeks post-MI, consistent with previous observations.[3] Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice showed no significant differences in QRS-interval (Figure 1C), P-wave duration (On-line Table 1), or QTc-interval (Figure 1D). Cav3.2$^{-/-}$ mice had no changes in any ECG-index (Online Table 2). MI significantly prolonged QRS and QTc-intervals, with similar changes in all KO and WT groups.

The mortality 7-days post-MI was similar for Cav3.1$^{-/-}$ and Cav3.1$^{+/+}$ mice (16/39, 41%, WT vs 22/46, 48%, KO, *P*=NS). The ratio of total ventricular weight (TVW) over body weight (BW), an index of cardiac hypertrophy, was increased in both groups 4-weeks post-MI (Figure 2A), without intergroup differences. Furthermore, the infarct size/total ventricular weight ratio was not different between Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice (Figure 2B), excluding infarct-size extension or reduction as a mediator of any changes. Similar results were observed in Cav3.2 mice, with no significant difference in post-MI mortality between groups (14/32, 44%, Cav3.2$^{+/+}$ vs 19/36, 53%, Cav3.2$^{-/-}$, *P*=NS). The TVW/BW ratio increased in both Cav3.2$^{+/+}$ and Cav3.2$^{-/-}$ mice 4 weeks post-MI vs baseline (Figure 2C); however, no significant difference was observed between the 2 groups. The infarct size was not different between Cav3.2$^{+/+}$ and Cav3.2$^{-/-}$ mice (Figure 2D).

3.2 Cardiac contractility and hemodynamics

LV fractional shortening (Figure 3A) and ejection fraction (Figure 3B) were not different in Cav3.1$^{-/-}$ mice compared with Cav3.1$^{+/+}$ at baseline. MI decreased LV fractional shortening and ejection fraction significantly in both groups. However, both fractional shortening and ejection fraction were more strongly decreased by MI in Cav3.1$^{-/-}$ mice (by 50.3%, 44.6% respectively) than Cav3.1$^{+/+}$ mice (by 34.3%, 28.5% respectively, $P<0.05$ for each). The LV contractility index was also significantly smaller in Cav3.1$^{-/-}$ vs Cav3.1$^{+/+}$ mice at 4 weeks post-MI (Figure 4A), but there were no significant differences in mean blood pressure (Figure 4B). There were no significant differences in LV fractional shortening (Figure 3C), ejection fraction (Figure 3D), the contractility index (Figure 4C) or blood pressure (Figure 4D) values of Cav3.2$^{-/-}$ versus Cav3.2$^{+/+}$ mice, either at baseline or post-MI. Post-MI hemodynamic impairment in Cav3.1$^{-/-}$ mice was also evidenced by significantly greater abnormalities in cardiac index and relaxation time (Online Table 1). Other indices of cardiac performance, such as maximum positive and negative LV pressure-generation (maxdP/dt and mindP/dt), end-diastolic pressure (Ped), end-systolic pressure (Pes), time-constant of relaxation (Tau) or stroke-volume (SV) were not significantly different between Cav3.1$^{-/-}$ and Cav3.1$^{+/+}$ mice (Online Table 1). Cav3.2$^{-/-}$ and Cav3.2$^{+/+}$ mice had comparable hemodynamic indices at baseline and post-MI for all variables (Online Table 2).

3.3 Cardiac electrophysiology and arrhythmias

Spontaneous ventricular tachyarrhythmias (VTs) were sometimes seen in the first 24 hours post-MI (Figure 5A). During the 24-hour post-MI telemetry period, spontaneous VT occurred in 2/7 Cav3.1$^{+/+}$ mice and 2/6 Cav3.1$^{-/-}$ mice (Figure 6A, P=NS). VTs were also inducible in some mice during electrophysiological study (Figure 5B), both at baseline assessment and 4 weeks post-MI. The prevalence of reproducible VT induction (Figure 6B) was not significantly different at baseline,

occurring in 1/8 Cav3.1$^{-/-}$ mice (versus 0/9 Cav3.1$^{+/+}$ mice). However, at 4 weeks post-MI, VT was inducible in 9 of 11 (82%) Cav3.1$^{-/-}$ mice, but only in 3 of 10 (30%) Cav3.1$^{+/+}$ mice (P<0.05). VT duration (692±113 ms Cav3.1$^{+/+}$, 607±160 ms, Cav3.1$^{-/-}$) and cycle length (47.3±4.1 ms Cav3.1$^{+/+}$, 52.0±3.6 ms Cav3.1$^{-/-}$) did not differ between groups. The inducibility of sustained AF was not significantly different between Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice at either baseline (0/9 versus 0/8 mice respectively) or 4 weeks post-MI (2/10 versus 3/11 mice). Mean AF durations were also not significantly different: 1.3±0.6 versus 1.9±0.9 seconds for Cav3.1$^{+/+}$ versus Cav3.1$^{-/-}$ mice at 4 weeks post-MI. No significant differences in AERP (Figure 6C) or VERP (Figure 6D) were observed between Cav3.1$^{-/-}$ and Cav3.1$^{+/+}$ mice. In Cav3.1$^{-/-}$ mice, the AH interval was significant longer compared with Cav3.1$^{+/+}$ mice at baseline as well as at 4 weeks post-MI (Online Table 1). Significant differences were also observed in the corrected SA node recovery time (SNRTc) at baseline and Wenckebach cycle length at baseline and 4 weeks post-MI (Online Table 1). Consistent with the absence of QRS differences between Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice, no significant differences were observed in HV interval. Cav3.2$^{-/-}$ and Cav3.2$^{+/+}$ mice showed no significant electrophysiological differences (Online Table 2).

3.4 Cav3.1 and Cav3.2 gene-expression

Cav3.1 and Cav3.2 gene-expression quantification data are shown in Figure 7. Cav3.1 was undetectable in both LA and LV at baseline and post-MI in Cav3.1$^{-/-}$ mice (Figure 7A). Cav3.2 expression (Figure 7B) was lower than that of Cav3.1 (Figure 7A) in Cav3.1$^{+/+}$ mice, confirming previous observations indicating that Cav3.1 is the dominant subunit in the mouse.[3,21] Cav3.1 expression did not change significantly post-MI (Figures 7A and 7C) in Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.2$^{+/+}$ mice, and Cav3.2 expression actually decreased post-MI in Cav3.1$^{+/+}$ mice (Figure 7B). Cav3.1 expression

was not altered in Cav3.2$^{-/-}$ knockout mice (Figure 7C). Cav3.2 was undetectable at baseline and post-MI in Cav3.2$^{-/-}$ mice (Figure 7D).

4. Discussion

In this study, we examined the response of Cav3.1$^{-/-}$ and Cav3.2$^{-/-}$ mice to post-myocardial infarction remodeling. We found that, contrary to expectations based on most previous pharmacological studies with I_{CaT}-blockers, post-MI remodeling was not improved by I_{CaT}-subunit deletion. In the case of Cav3.1, post-MI remodeling was worsened, and in the case of Cav3.2 it was unaltered.

4.1 Comparison to previous studies of effects of I_{CaT}-inhibition on cardiac remodeling

A variety of studies used the I_{CaT}-selective blocker mibefradil to assess effects of I_{CaT}-inhibition on remodeling. Min et al observed improved hemodynamics in post-MI rats treated with mibefradil, compared to minor effects of amlodipine and verapamil.[9] Sandmann et al noted reduced post-MI fibrosis as well as improved hemodynamics with mibefradil, with the greatest benefit observed when treatment began pre-infarction.[6] Mozaffari et al found that mibefradil was particularly effective in attenuating the effect of high afterload on infarct size.[22] Two studies indicated greater protection by mibefradil versus I_{CaL}-selective blockers against ischemic damage in Langendorff-perfused hearts.[10,11] Mibefradil was also found to prevent exercise-induced myocardial stunning in dogs,[7] glucose-induced neonatal-rat cardiomyocyte proliferation[5] and atrial tachycardia-induced atrial electrical remodeling.[12]

Not all studies have pointed to benefits from I_{CaT}-blockade. Xia et al noted that ramipril improved post-MI remodeling in stroke-prone spontaneously-hypertensive rats, but that mibefradil was not protective and even increased left-ventricular end-diastolic pressures.[13] Takebayashi et al found deleterious effects on right-ventricular twitch tension in rats exposed to monocrotaline to induce pulmonary hypertension and right-ventricular hypertrophy.[14]

In the present study, we used a genetic-engineering approach to suppress I_{CaT} by specifically knocking out the T-type Ca^{2+}-channel subunits Cav3.1 and Cav3.2. We saw no evidence of protection against post-MI remodeling with I_{CaT} α-subunit deletion. On the contrary, Cav3.1-KO mice developed greater post-MI impairments in myocardial function and more arrhythmia susceptibility than WT mice. The discrepancy from previous results obtained with mibefradil as a pharmacological probe may relate to the limited specificity of mibefradil. In addition to inhibiting I_{CaT}, mibefradil also suppresses I_{CaL},[23] I_{Na},[24] I_{Kr}[25] and cytochrome function,[26] any of which could have contributed, along with presently-unrecognized actions of the compound, to its effects.

4.2 Recent insights into T-type Ca^{2+}-channel function from genetically-engineered mouse models

The ability to produce mice that are genetically-engineered to lack Cav3-channel subunits is providing new insights into the functional role of I_{CaT}. Mangoni et al showed that I_{Ca} knockout impairs sinus node automaticity and atrioventricular node conduction, indicating an important role in nodal function.[3] Jaleel et al studied the effects of I_{CaT} augmentation by Cav3.1 overexpression and compared them with the effects of I_{CaL} enhancement by overexpression of the L-type Ca^{2+}-channel β2a-subunit.[16] Although Ca^{2+}-influx was increased similarly in both models, enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-loading only occurred with I_{CaL} enhancement and Cav3.1-overexpression produced smaller contractile enhancement. Nakayama et al recently examined the effect of Cav3.1-overexpression and knockout on various forms of cardiac hypertrophy.[17] They noted exaggerated hypertrophic remodeling with Cav3.1 knockout and reduced hypertrophy with Cav3.1 enhancement. In contrast, Chiang et al did not observe an effect of Cav3.1 knockout on pressure-overload hypertrophy, but identified an important role for Cav3.2-subunits in the hypertrophic response to pressure overload, with the presence of Cav3.2-subunits being essential for calcineurin/NFAT hypertrophic signaling to occur.[18] Consistent

with the findings of Nakayama et al, and different from those of Chiang and coworkers, we found that Cav3.1 knockout enhanced adverse cardiac remodeling whereas Cav3.2 knockout had no effect.

4.3 Novelty and potential significance

Our study is the first to test the effects of specific T-type I_{Ca} suppression by genetic engineering on the remodeling response to acute MI. We found that, contrary to expectations from most previous pharmacological studies, I_{CaT}-suppression is not beneficial against post-MI remodeling, and may in fact be harmful. Adverse myocardial remodeling is an important determinant of outcome after acute myocardial infarction.[27] There is presently great interest in developing novel therapeutic targets for post-MI remodeling intervention.[28] Based on the available pharmacological data, I_{CaT} appears to be an interesting target. The prototype agent, mibefradil, was withdrawn because of off-target inhibitory effects on cytochromes that caused potentially-disastrous pharmacokinetically-based drug interactions.[29] The pharmaceutical industry has been working actively to develop novel T-type Ca^{2+}-channel blockers with improved selectivity and safety. One of these, efonidipine, has slightly more T/L-channel blocking selectivity than mibefradil and has also been shown to have beneficial effects on myocardial remodeling.[30] Our results suggest that I_{CaT}-blockade that targets Cav3.1-subunits may not be a beneficial property and should be avoided in the search for increasingly-selective compounds. Whether targeting other I_{CaT} subunits like Cav3.2 is beneficial for other forms of remodeling, such as that caused by atrial fibrillation,[8,12] remains to be determined.

Our work complements recent studies of I_{CaT} participation in hypertrophic mouse models.[17,18] These studies obtained contradictory information about the role of Cav3.1 subunits. Our observations support the notion that the absence of Cav3.1 subunits exaggerates adverse cardiac remodeling, and argue against negative consequences of Cav3.2 knockout. Our work extends the available knowledge base to the clinically-important context of post-MI remodeling, about which there had been no

information from mouse models engineered to lack I_{CaT} subunits. Interestingly, we did not observe any differences in ventricular weight or ventricular weight/body weight ratios among groups, suggesting that Cav3.1$^{-/-}$-associated adverse remodeling was not associated with changes in cardiac hypertrophic responses.

Acknowledgments

The authors thank Chantal St-Cyr and Nathalie L'Heureux, Maya Mamarbachi for technical assistance, and France Thériault for secretarial help.

Funding Sources

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Care Research (MOP 68929) and the Mathematics of Information Technology and Complex Systems (MITACS) Network.

Disclosures

None.

References

1. Ertel SI, Ertel EA, Clozel JP. T-type Ca^{2+} channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;**11**:723-739.
2. Vassort G, Talavera K, Alvarez JL. Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Cell Calcium* 2006;**40**:205-220.
3. Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K et al. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res* 2006;**98**:1422-1430.
4. Nuss HB, Houser SR. T-type Ca^{2+} current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res* 1993;**73**:777-782.
5. Li M, Zhang M, Huang L, Zhou J, Zhuang H, Taylor JT et al. T-type Ca^{2+} channels are involved in high glucose-induced rat neonatal cardiomyocyte proliferation. *Pediatr Res* 2005;**57**:550-556.
6. Sandmann S, Min JY, Meissner A, Unger T. Effects of the calcium channel antagonist mibefradil on haemodynamic parameters and myocardial Ca^{2+}-handling in infarct-induced heart failure in rats. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:67-80.
7. de Curzon OP, Ghaleb B, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Beneficial effects of the T- and L-type calcium channel antagonist, mibefradil, against exercise-induced myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**35**:240-248.
8. Fareh S, Bénardeau 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.
9. Min JY, Sandmann S, Meissner A, Unger T, Simon R. Differential effects of mibefradil, verapamil, and amlodipine on myocardial function and intracellular Ca^{2+} handling in rats with chronic myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**:1038-1044.

10. Arh M, Budihna MV. Comparison of effects of nitrendipine, lacidipine and mibefradil on postischaemic myocardial damage in isolated rat hearts. *Pflugers Arch* 2000;**440**(5 Suppl):R149-R150.

11. Kuhar CG, Budihna MV, Pleskovic RZ. Mibefradil is more effective than verapamil for restoring post-ischemic function of isolated hearts of guinea pigs with acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2004;**488**:137-146.

12. Fareh S, Bénardeau 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.

13. Xia QG, Reinecke A, Dorenkamp M, Storz C, Bitterling H, Penz S et al. Comparison of cardioprotective effects of mibefradil and ramipril in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;**25**:763-768.

14. Takebayashi S, Li Y, Kaku T, Inagaki S, Hashimoto Y, Kimura K et al. Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**345**:766-773.

15. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S et al. T-type Ca^{2+} channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation* 2009;**120**:743-752.

16. Jaleel N, Nakayama H, Chen X, Kubo H, MacDonnell S, Zhang H et al. Ca^{2+} influx through T- and L-type Ca^{2+} channels have different effects on myocyte contractility and induce unique cardiac phenotypes. *Circ Res* 2008;**103**:1109-1119.

17. Nakayama H, Bodi I, Correll RN, Chen X, Lorenz J, Houser SR et al. Alpha1G-dependent T-type Ca^{2+} current antagonizes cardiac hypertrophy through a NOS3-dependent mechanism in mice. *J Clin Invest* 2009;**119**:3787-3796.

18. Chiang CS, Huang CH, Chieng H, Chang YT, Chang D, Chen JJ et al. The Ca(v)3.2 T-type Ca^{2+} channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* 2009;**104**:522-530.

19. 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.

20. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;**274**:H747-H751.

21. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005;**562**(Pt 1):223-234.

22. Mozaffari MS, Patel C, Schaffer SW. Mechanisms underlying afterload-induced exacerbation of myocardial infarct size: role of T-type Ca^{2+} channel. *Hypertension* 2006;**47**:912-919.

23. Lee TS, Kaku T, Takebayashi S, Uchino T, Miyamoto S, Hadama T et al. Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T- and L-type Ca channels with distinct inhibitory mechanisms. *Pharmacology* 2006;**78**:11-20.

24. Eller P, Berjukov S, Wanner S, Huber I, Hering S, Knaus HG et al. High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. *Br J Pharmacol* 2000;**130**:669-677.

25. Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. HERG and KvLQT1/IsK, the cardiac K^+ channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol Pharmacol* 1998;**54**:695-703.

26. Welker HA, Wiltshire H, Bullingham R. Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet* 1998;**35**:405-423.

27. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;**35**:569-582.

28. Landmesser U, Wollert KC, Drexler H. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:519-527.

29. Po AL, Zhang WY. What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market? *Lancet* 1998;**351**:1829-1830.

30. Suzuki S, Ohkusa T, Ono K, Sato T, Yoshida MA, Yano M et al. Beneficial effects of the dual L- and T-type Ca^{2+} channel blocker efonidipine on cardiomyopathic hamsters. *Circ J* 2007;**71**:1970-1976.

Figure Legends

Figure 1. Surface electrocardiogram results obtained in sedated Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice. Mean±SEM of RR **(A)**, PR **(B)**, QRS **(C)** and QTc **(D)** intervals obtained from Cav3.1$^{+/+}$ (grey bars) and Cav3.1$^{-/-}$ (black bars) mice, before and 4 weeks (4-w) post-MI. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ANOVA with Bonferroni post-tests. (n=9 for Cav3.1$^{+/+}$ and n=12 for Cav3.1$^{-/-}$ mice).

Figure 2. **A,** Total ventricular weight (TVW) to body weight (BW) ratios, a quantitative index of cardiac hypertrophy, at baseline and 4 weeks post-MI of Cav3.1$^{+/+}$ vs Cav3.1$^{-/-}$ mice. **B,** The ratio of infarcted-zone ventricular weight (IVW) to total ventricular weight (TVW) at 4-w post-MI of Cav3.1$^{+/+}$ vs Cav3.1$^{-/-}$ mice. **C**, TVW/BW ratios at baseline and post-MI for Cav3.2$^{+/+}$ vs Cav3.2$^{-/-}$ mice. **D,** IVW/TVW ratios for Cav3.2$^{+/+}$ vs Cav3.2$^{-/-}$ mice. **P<0.01, ***P<0.001, ANOVA with Bonferroni post-tests. (n=6 for all observations).

Figure 3. Cardiac function of WT and KO mice at baseline and 4 weeks (4-w) post-MI. Echocardiographic results for left-ventricular fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) of Cav3.1$^{+/+}$ (n=9) vs Cav3.1$^{-/-}$ (n=7) mice (**A, B**) and Cav3.2$^{+/+}$ (n=6) vs Cav3.2$^{-/-}$ (n=5) mice (**C**, **D**).

Figure 4. Hemodynamic analyses including contractility index and mean systemic arterial pressure of Cav3.1$^{+/+}$ vs Cav3.1$^{-/-}$ mice (**A, B**) and Cav3.2$^{+/+}$ vs Cav3.2$^{-/-}$ mice (**C**, **D**). Detailed results for all hemodynamic and echocardiographic indices are provided in Online Table 1

(Cav3.1 mice) and Online Table 2 (Cav3.2 mice). *P<0.05, **P<0.01, ANOVA with Bonferroni post-tests. (n=6 and n=5 for all observations of Cav3.1; Cav3.2 mice, respectively).

Figure 5. Examples of ventricular tachyarrhythmias post-MI. **A**, Spontaneous monomorphic ventricular tachycardias recorded by ambulatory telemetry in an awake, unrestrained Cav3.1$^{-/-}$ mouse within 24 hours post-MI. **B**, Ventricular tachycardia induced by programmed electrical stimulation in a Cav3.1$^{-/-}$ mouse under general anaesthesia at 4 weeks post-MI. Top: ECG lead I; Bottom: intracardiac electrogram (Endo.). A train of 9 basic (S1) stimuli was applied at a 100-ms cycle length, followed by 2 extrastimuli (S2, S3).

Figure 6. **A**, The percentage of animals showing spontaneous ventricular tachyarrhythmias over the first 24 hours post-MI was not different between Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice (Fisher's exact test). **B**, Percentage of Cav3.1 mice with inducible ventricular tachyarrhythmias 4 weeks post-MI (Fisher's exact test, *P<0.05 for Cav3.1$^{-/-}$ vs Cav3.1$^{+/+}$). **C, D**: Atrial and ventricular effective refractory periods (AERP and VERPs respectively) were similar between Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ mice (n=9 and n=8 respectively) at baseline as well as at 4 weeks post-MI (n=10 and n=11 respectively, ANOVA with Bonferroni post-tests).

Figure 7. Mean±SEM Cav3.1 and Cav3.2 mRNA expression in left atrial (LA) and left ventricular (LV) tissues at baseline and 4 weeks post-MI, for Cav3.1$^{+/+}$ and Cav3.1$^{-/-}$ (**A** and **C**) and Cav3.2$^{+/+}$ and Cav3.2$^{-/-}$ (**B** and **D**) mice. For Cav3.1 mice and Cav3.1 measurements (**A**), n=7, 7, 6, 6 samples for Cav3.1$^{+/+}$ LA, Cav3.1$^{+/+}$ LV, Cav3.1$^{-/-}$ LA, Cav3.1$^{-/-}$ LV at baseline respectively and n=6, 6, 6, 6 samples for the same groups respectively post-MI; for Cav3.2 measurements (**B**), n=6, 7, 5, 6 samples respectively at baseline for Cav3.1$^{+/+}$ LA, Cav3.1$^{+/+}$ LV, Cav3.1$^{-/-}$ LA, Cav3.1$^{-/-}$ LV and n=6, 6, 6, 6,

samples for the corresponding groups post-MI. For Cav3.2 mice and Cav.3.1 measurements (**C**), *n*=7, 7, 7, 7 samples respectively at baseline for $Cav3.2^{+/+}$ LA, $Cav3.2^{+/+}$ LV, $Cav3.2^{-/-}$ LA, $Cav3.2^{-/-}$ LV and 10, 10, 6, 6 samples for the same groups respectively post-MI; for Cav3.2 measurements (**D**) *n*=7, 7, 7, 7 samples respectively at baseline for $Cav3.1^{+/+}$ LA, $Cav3.1^{+/+}$ LV, $Cav3.1^{-/-}$ LA, $Cav3.1^{-/-}$ LV and 10, 10, 6, 6 samples for the corresponding groups post-MI. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ANOVA with Tukey post-tests.

Figure 1

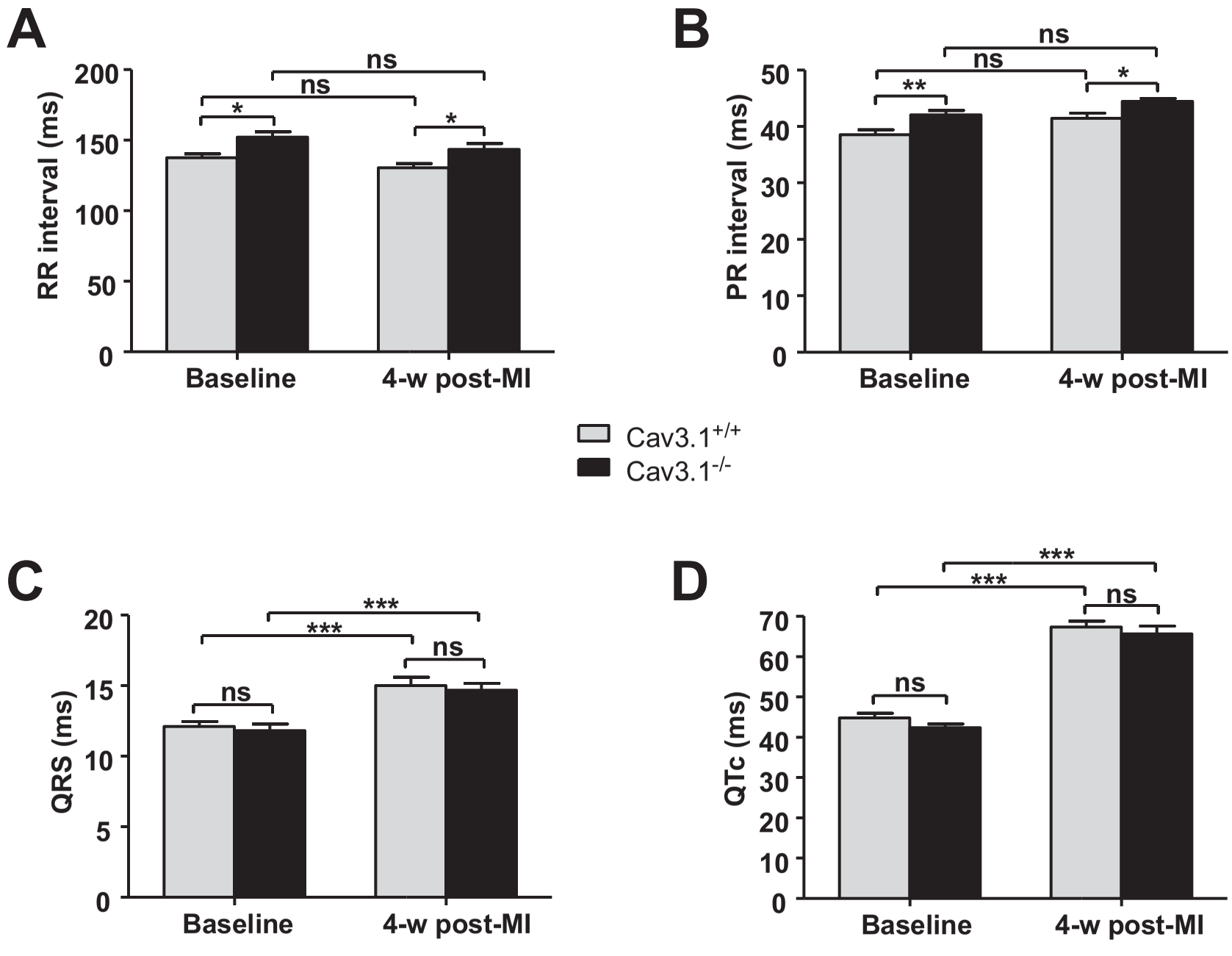

Figure 1

Figure 2

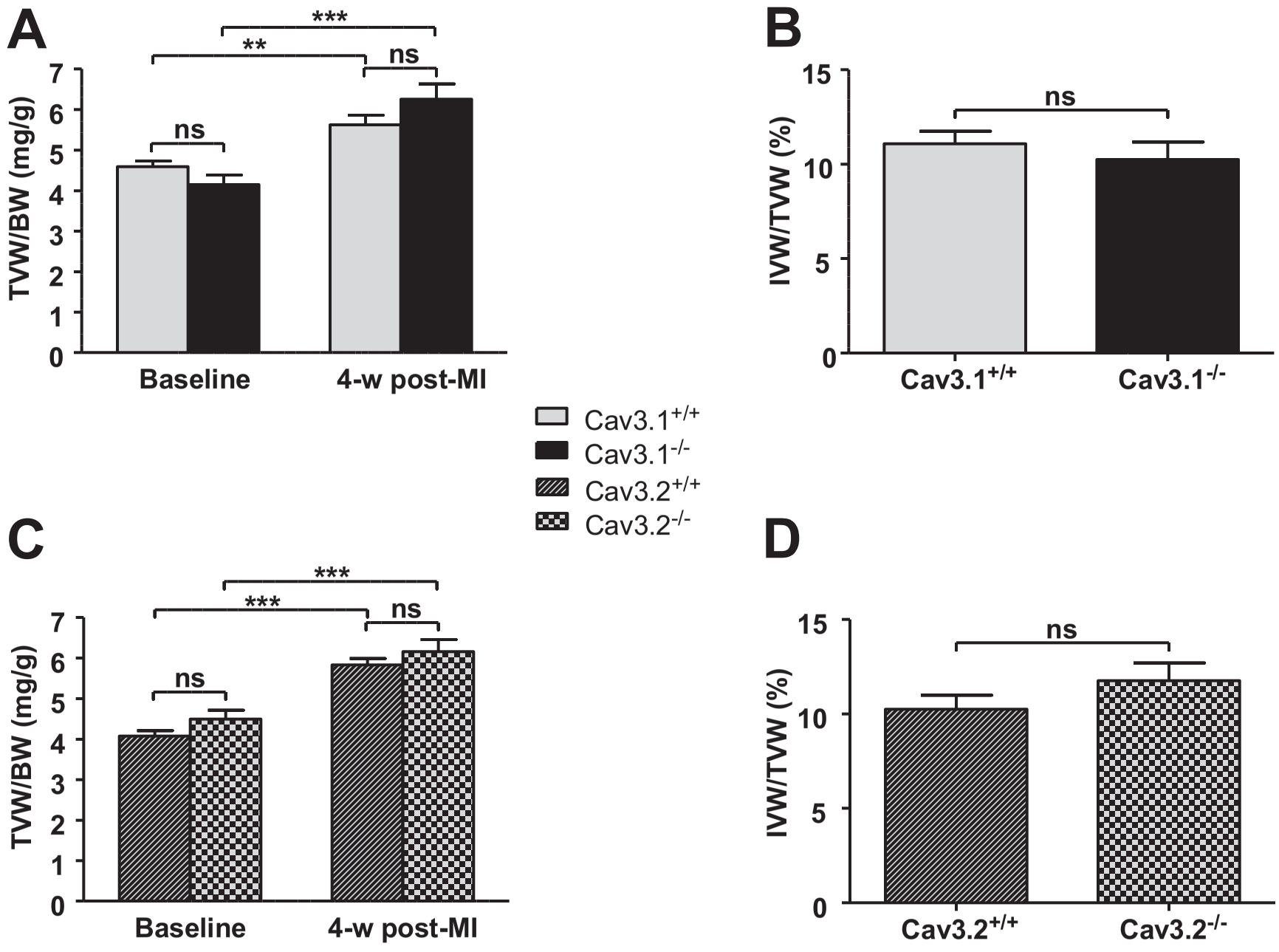

Figure 2

Figure 3

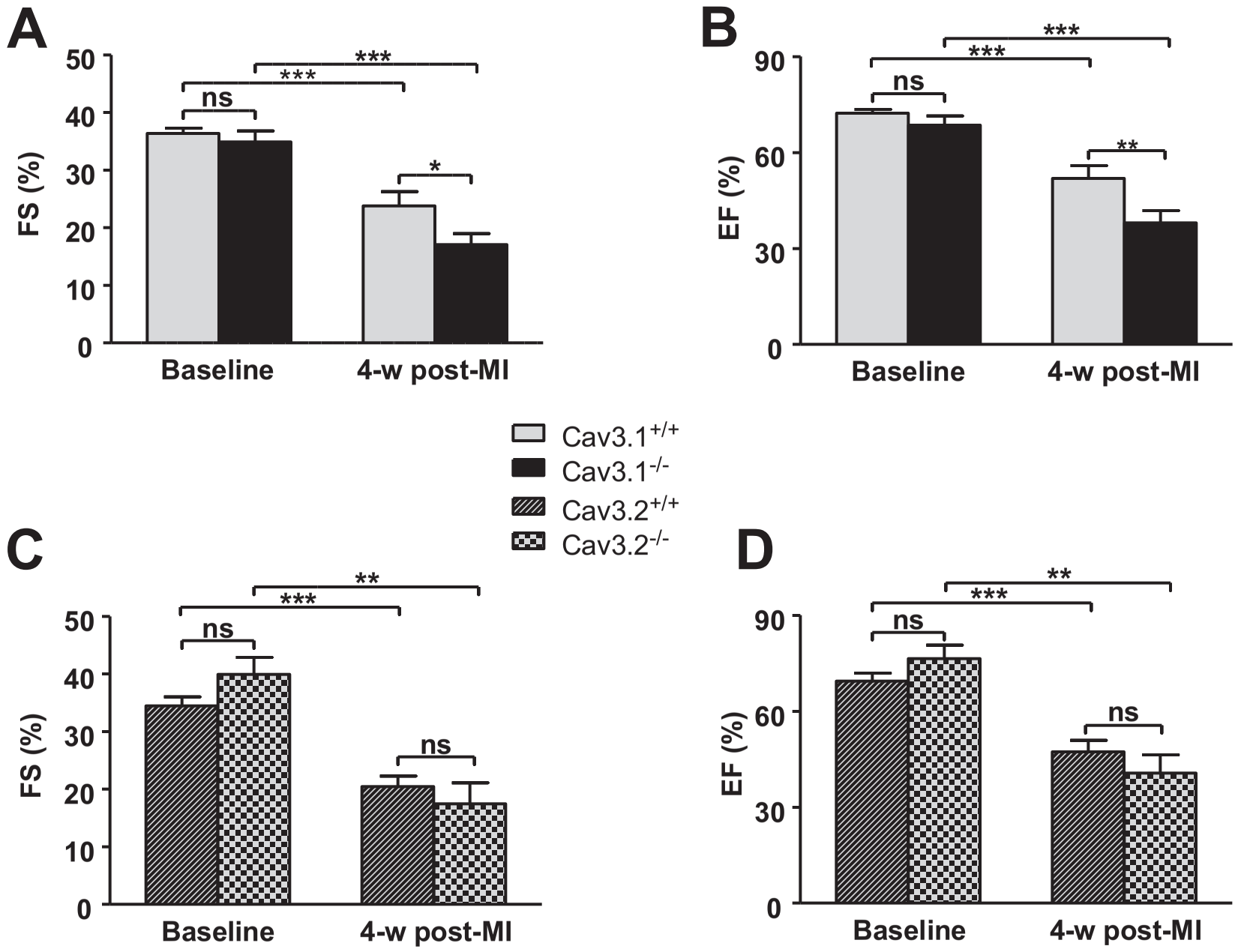

Figure 3

Figure 4

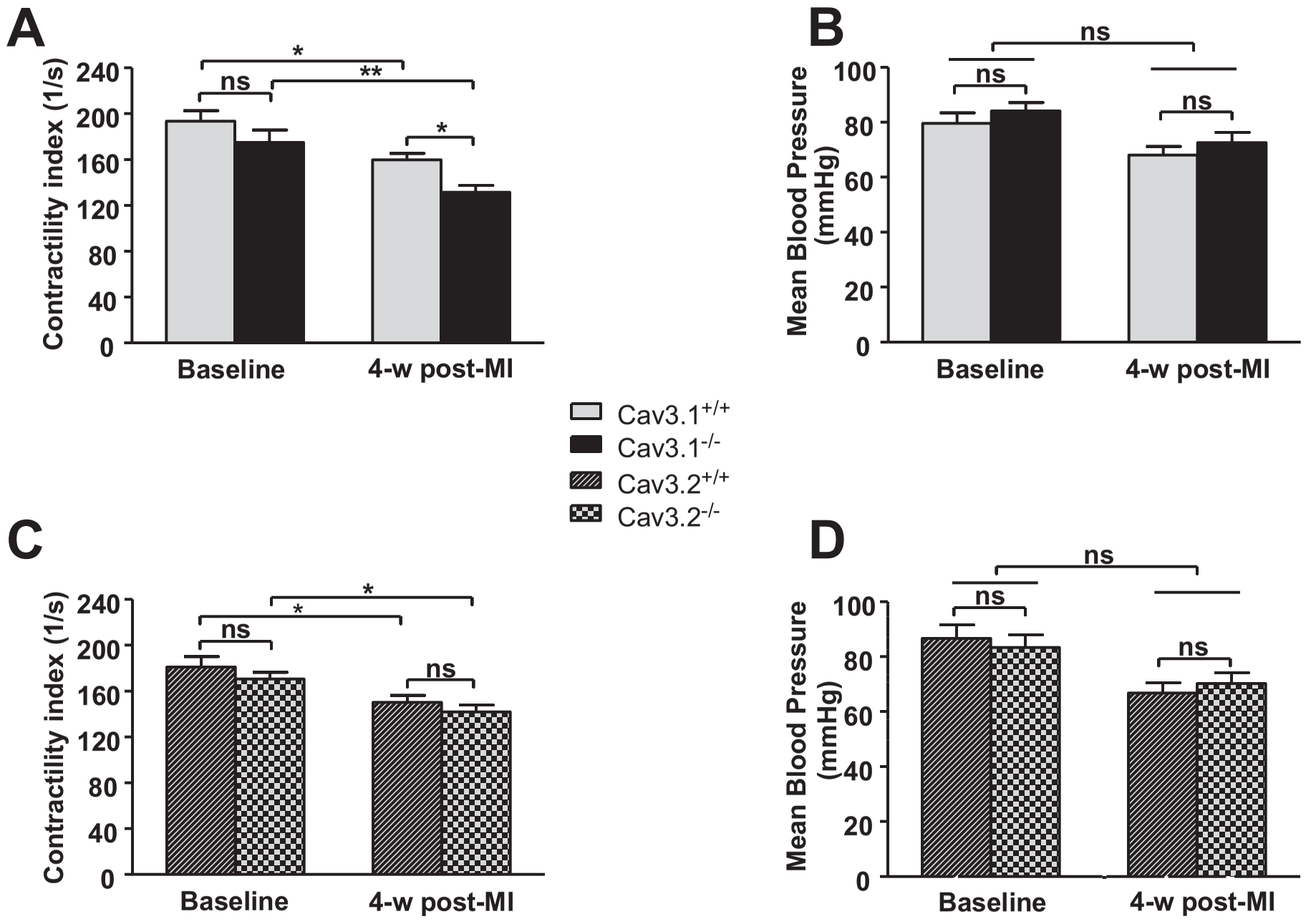

Figure 4

Figure 5

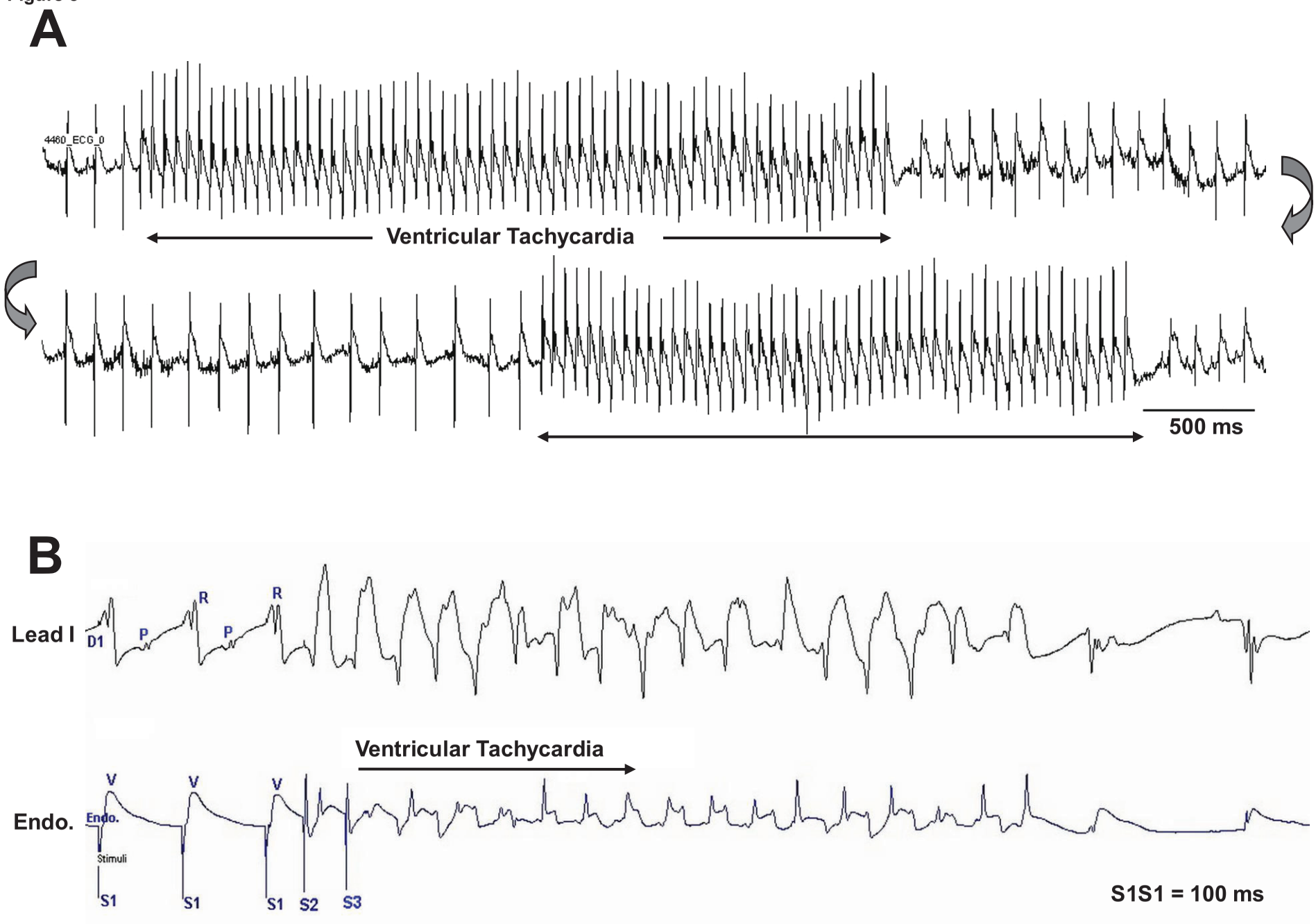

Figure 5

Figure 6

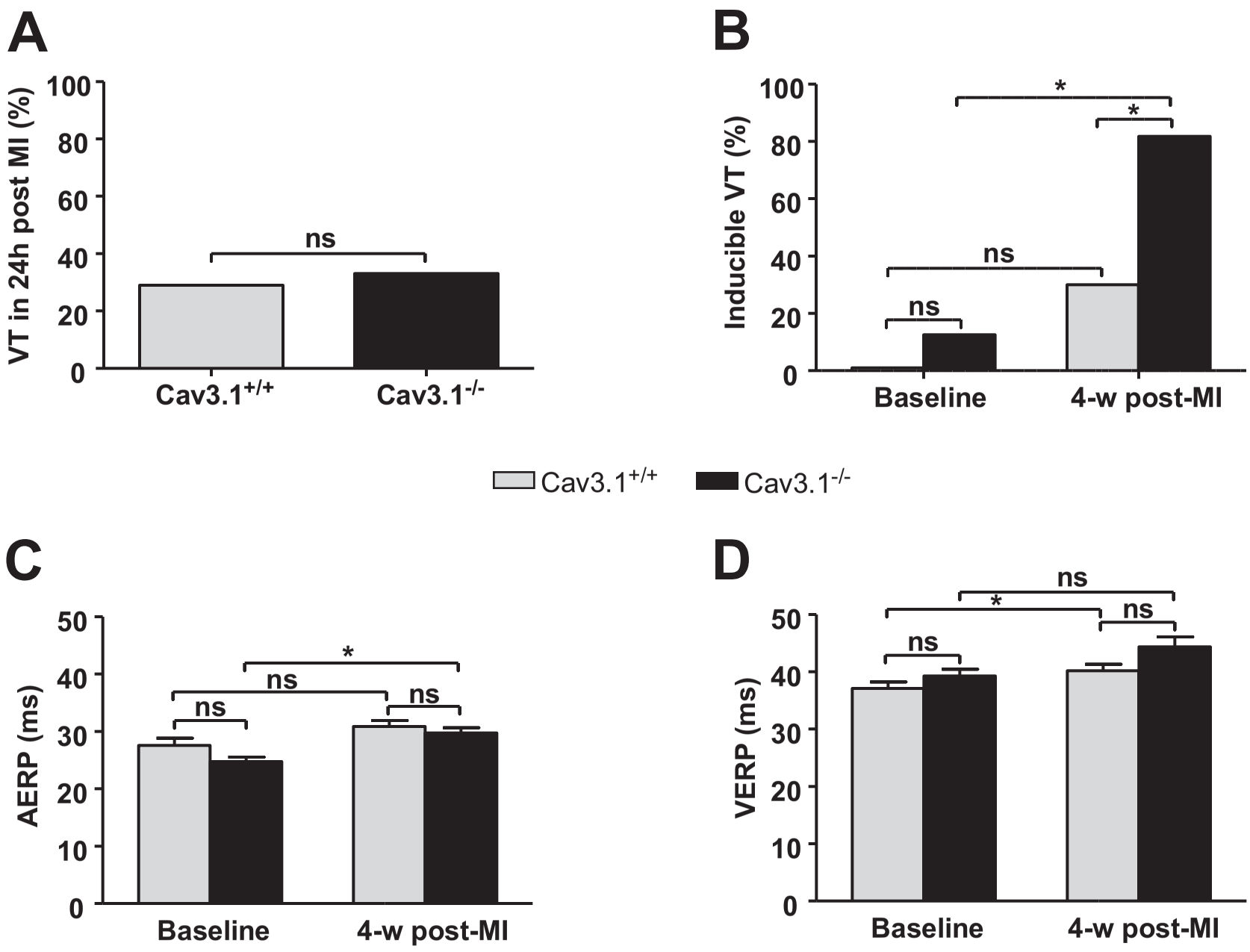

Figure 6

Figure 7

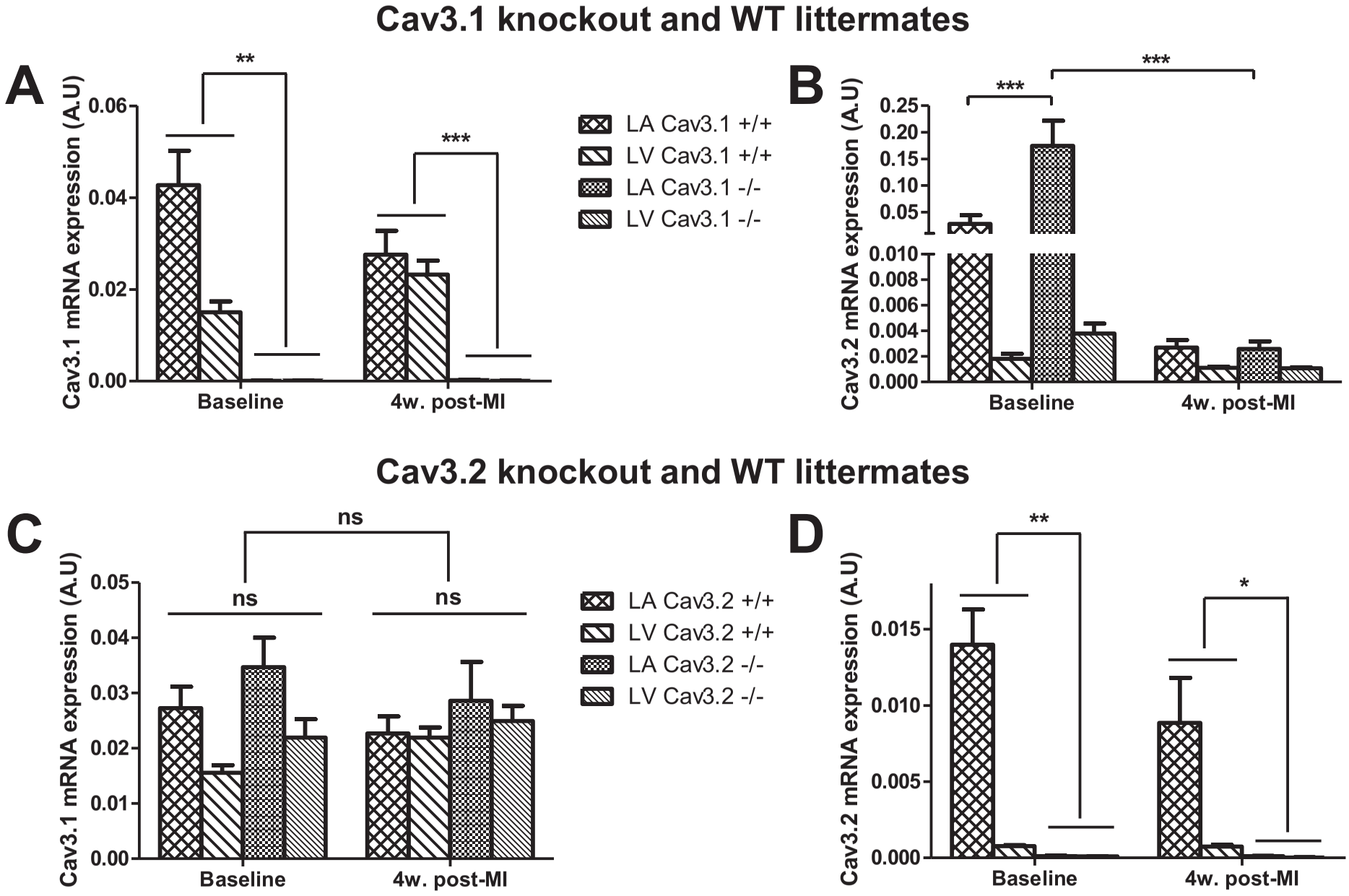

Figure 7

On-line Table 1

	Baseline			4 wks post-MI		
ECG	**WT (n = 9)**	**KO (n = 12)**	**Stat. test**	**WT (n = 9)**	**KO (n = 12)**	**Stat. test**
P wave (ms)	16.6 ± 0.2	17.1 ± 0.4	*P=NS*	17.9 ± 0.7	17.0 ± 0.4	*P=NS*
PQ interval (ms)	38.6 ± 0.8	42.1 ± 0.8	***P<0.01***	41.4 ± 0.9	44.4 ± 0.6	***P<0.05***
QRS (ms)	12.1 ± 0.4	11.8 ± 0.3	*P=NS*	14.3 ± 0.4	14.2 ± 0.7	*P=NS*
QTc (ms)	43.7 ± 1.4	42.7 ± 0.7	*P=NS*	67.3 ± 1.5	66.1 ± 2.1	*P=NS*
RR interval (ms)	137.6 ± 2.9	152.3 ± 3.7	***P<0.05***	130.6 ± 2.8	141.6 ± 3.8	***P<0.05***
EP study	**n = 9**	**n = 8**		**n = 10**	**n = 11**	
AERP (ms)	27.6 ± 1.3	24.8 ± 0.8	*P=NS*	30.9 ± 1.0	29.7 ± 0.9	*P=NS*
VERP (ms)	37.1 ± 1.1	39.3 ± 1.2	*P=NS*	40.2 ± 1.1	44.4 ± 2.0	*P=NS*
SNRTc (ms)	21.7 ± 2.1	30.9 ± 3.6	***P<0.05***	31.3 ± 3.2	38.9 ± 2.2	*P=NS*
WBCL (ms)	72.4 ± 2.0	84.9 ± 3.1	***P<0.05***	79.1 ± 1.9	87.1 ± 3.1	***P<0.05***
SACT (ms)	25.2 ± 4.5	28.0 ± 3.4	*P=NS*	27.3 ± 3.2	29.5 ± 2.6	*P=NS*
AH (ms)	27.4 ± 0.6	31.6 ± 0.8	***P<0.05***	29.7 ± 0.6	32.8 ± 0.9	***P<0.001***
HV (ms)	9.0 ± 0.4	9.6 ± 0.5	*P=NS*	10.2 ± 0.5	11.0 ± 0.6	*P=NS*
Sustained AF	0/9	0/8	*P=NS*	2/10	3/11	*P=NS*
Mean duration of AF (s)	0	0	*P=NS*	1.3 ± 0.6	1.9 ± 0.9	*P=NS*
Echocardiography	**n = 9**	**n = 7**		**n = 9**	**n = 7**	
FS (%)	36.2 ± 1.0	34.4 ± 1.9	*P=NS*	23.8 ± 2.5	17.1 ± 1.9	***P<0.05***
EF (%)	72.5 ± 1.3	68.6 ± 2.8	*P=NS*	51.8 ± 3.9	38.0 ± 3.9	***P<0.01***
CO (ml/m)	18.6 ± 1.0	20.5 ± 1.8	*P=NS*	19.0 ± 1.4	19.0 ± 2.3	*P=NS*
SV (ml)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	*P=NS*	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	*P=NS*
Hemodynamics	**n = 6**	**n = 6**		**n = 6**	**n = 6**	
Max dPdt (mmHg/s)	8000 ± 877	6069 ± 643	*P=NS*	5489 ± 306	5145 ± 274	*P=NS*
Min dPdt (mmHg/s)	-5973 ± 847	-5293 ± 814	*P=NS*	-3893 ± 159	-3846 ± 197	*P=NS*
CI (s^{-1})	193 ± 9	174 ± 11	*P=NS*	159 ± 6	129 ± 4	***P<0.01***
Tau (ms)	7.0 ± 0.4	8.8 ± 0.5	*P=NS*	9.7 ± 1.0	9.5 ± 1.0	*P=NS*
Ped (mmHg)	6.5 ± 1.1	8.1 ± 1.6	*P=NS*	7.9 ± 0.9	8.7 ± 1.4	*P=NS*
Pes (mmHg)	92.5 ± 4.0	90.1 ± 3.2	*P=NS*	85.2 ± 3.3	79.6 ± 4.8	*P=NS*
CT (ms)	10.9 ± 1.0	11.9 ± 1.4	*P=NS*	12.4 ± 1.5	15.3 ± 0.6	*P=NS*
RT (ms)	41.4 ± 1.1	44.3 ± 1.7	*P=NS*	44.5 ± 0.7	48.9 ± 0.9	***P<0.05***
Weights	**n = 6**	**n = 6**		**n = 6**	**n = 6**	
BW (g)	33.4 ± 1.5	30.3 ± 1.4	*P=NS*	32.2 ± 0.6	31.6 ± 1.0	*P=NS*
HW (mg)	164.9 ± 11.3	138.4 ± 9.7	*P=NS*	194.6 ± 6.0	214.8 ± 15.5	*P=NS*
TVW (mg)	153.9 ± 10.2	127.4 ± 9.7	*P=NS*	176.3 ± 3.9	197.5 ± 13.6	*P=NS*
TVW/BW (mg/g)	4.6 ± 0.1	4.2 ± 0.2	*P=NS*	5.5 ± 0.1	6.3 ± 0.4	*P=NS*
IW/TVW (%)				11.0 ± 0.7	10.2 ± 0.9	*P=NS*

Online Table 1: Results summary of Cav3.1 mice at baseline and 4 weeks post-MI. ***AERP***: Atrial effective refractory period, ***VERP***: Ventricular effective refractory period, ***SNRTc***: Sinus node recovery time corrected, ***SACT***: sinoatrial conduction time, ***WBCL***: Wenkebach cycle length, ***AF***: Atrial fibrillation, ***FS***: Fractional shortening, ***EF***: Ejection fraction, ***CO***: Cardiac output, ***SV***: Stroke volume, ***Max dPdt***: Maximum rate of increase in pressure during contraction (positive slope), ***Min dPdt***: Maximum rate of decrease in pressure during relaxation (negative slope), ***CI***: Contractility index - the max dPdt divided by the pressure at this point ((dPdt)max/P), ***Tau***: Time constant of relaxation, ***Ped***: End diastolic pressure, ***Pes***: End systolic pressure, ***CT***: Contraction time, ***RT***: Relaxation time, ***BW***: Body weight, ***HW***: Heart weight, ***TVW***: Total ventricular weight, ***IW***: Infarcted zone weight.

On-line Table 2

	Baseline			4w post-MI		
ECG	**WT (n = 6)**	**KO (n = 6)**	**Stat. test**	**WT (n = 6)**	**KO (n = 6)**	**Stat. test**
P wave (ms)	15.5 ± 0.4	16.3 ± 0.4	*P=NS*	16.7 ± 0.6	17.3 ± 0.7	*P=NS*
PQ interval (ms)	37.5 ± 1.0	39.8 ± 1.2	*P=NS*	3.8 ± 1.1	42.0 ± 1.1	*P=NS*
QRS (ms)	11.7 ± 0.3	11.2 ± 0.5	*P=NS*	15.8 ± 0.7	16.3 ± 0.9	*P=NS*
QTc (ms)	49.3 ± 2.1	51.0 ± 1.6	*P=NS*	65.2 ± 1.1	67.2 ± 1.2	*P=NS*
RR interval (ms)	125.2 ± 4.4	132.2 ± 5.8	*P=NS*	123.0 ± 5.9	129.3 ± 4.1	*P=NS*
EP study	**n = 7**	**n = 6**		**n = 6**	**n = 6**	
AERP (ms)	23.7 ± 1.2	25.6 ± 1.5	*P=NS*	28.5 ± 1.9	33.3 ± 3.2	*P=NS*
VERP (ms)	32.0 ± 2.3	35.1 ± 1.6	*P=NS*	39.3 ± 2.5	43.5 ± 2.1	*P=NS*
SNRTc (ms)	19.3 ± 1.9	25.0 ± 4.1	*P=NS*	32.5 ± 3.6	36.8 ± 3.2	*P=NS*
WBCL (ms)	74.2 ± 2.6	76.4 ± 3.3	*P=NS*	79.8 ± 4.5	88.5 ± 4.8	*P=NS*
SACT (ms)	23.5 ± 2.9	28.0 ± 3.3	*P=NS*	25.2 ± 3.9	31.5 ± 2.0	*P=NS*
AH (ms)	29.0 ± 0.9	30.3 ± 0.8	*P=NS*	31.0 ± 0.7	31.7 ± 1.0	*P=NS*
HV (ms)	8.2 ± 0.4	8.7 ± 0.6	*P=NS*	9.5 ± 0.8	10.5 ± 0.4	*P=NS*
Sustained AF	0/7	0/6	*P=NS*	2/6	3/6	*P=NS*
Mean duration of AF (s)	0	0	*P=NS*	2.9 ± 0.8	0.8 ± 0.1	*P=NS*
Echocardiography	**n = 6**	**n = 5**		**n = 6**	**n = 5**	
FS (%)	34.5 ± 1.6	39.9 ± 3.0	*P=NS*	20.5 ± 1.8	17.5 ± 3.6	*P=NS*
EF (%)	69.4 ± 2.5	75.6 ± 3.5	*P=NS*	47.4 ± 3.6	40.2 ± 7.6	*P=NS*
CO (ml/m)	19.0 ± 2.8	24.9 ± 3.4	*P=NS*	17.6 ± 2.0	22.1 ± 1.8	*P=NS*
SV (ml)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	*P=NS*	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	*P=NS*
Hemodynamics	**n = 5**	**n = 5**		**n = 5**	**n = 5**	
Max dPdt (mmHg/s)	8015 ± 671	7852 ± 294	*P=NS*	6331 ± 205	5352 ± 553	*P=NS*
Min dPdt (mmHg/s)	-7471 ± 644	-7514 ± 425	*P=NS*	-4551 ± 176	-4263 ± 423	*P=NS*
CI (s^{-1})	181 ± 9	169 ± 4.5	*P=NS*	150 ± 6	141.8 ± 6	*P=NS*
Tau (ms)	7.4 ± 0.7	7.2 ± 0.4	*P=NS*	10.6 ± 0.5	11.8 ± 0.6	*P=NS*
Ped (mmHg)	9.2 ± 0.4	10.2 ± 1.9	*P=NS*	10.4 ± 1.0	9.4 ± 2.3	*P=NS*
Pes (mmHg)	102.0 ± 2.2	107.0 ± 4.5	*P=NS*	89.0 ± 1.7	87.0 ± 6.5	*P=NS*
CT (ms)	8.2 ± 0.2	9.0 ± 0.3	*P=NS*	14.8 ± 0.5	13.6 ± 0.4	*P=NS*
RT (ms)	40.2 ± 0.4	41.6 ± 0.7	*P=NS*	46.0 ± 1.3	47.6 ± 0.5	*P=NS*
Weights	**n = 6**	**n = 6**		**n = 6**	**n = 6**	
BW (g)	31.5 ± 1.4	28.7 ± 0.6	*P=NS*	32.6 ± 1.0	30.7 ± 1.3	*P=NS*
HW (mg)	138.2 ± 3.8	141.5 ± 6.6	*P=NS*	206.9 ± 7.1	210.5 ± 12.3	*P=NS*
TVW (mg)	127.7 ± 3.8	131.3 ± 6.3	*P=NS*	187.9 ± 6.3	194.8 ± 10.1	*P=NS*
TVW/BW (mg/g)	4.1 ± 0.1	4.6 ± 0.2	*P=NS*	5.8 ± 0.3	6.4 ± 0.4	*P=NS*
IW/TVW (%)				10.6 ± 0.7	11.9 ± 0.9	*P=NS*

Online Table 2: Results summary of Cav3.2 mice at baseline and 4 weeks post-MI. ***AERP***: Atrial effective refractory period, ***VERP***: Ventricular effective refractory period, ***SNRTc***: Sinus node recovery time corrected, ***SACT***: sinoatrial conduction time, ***WBCL***: Wenkebach cycle length, ***AF***: Atrial fibrillation, ***FS***: Fractional shortening, ***EF***: Ejection fraction, ***CO***: Cardiac output, ***SV***: Stroke volume, ***Max dPdt***: Maximum rate of increase in pressure during contraction (positive slope), ***Min dPdt***: Maximum rate of decrease in pressure during relaxation (negative slope), ***CI***: Contractility index - the max dPdt divided by the pressure at this point ((dPdt)max/P), ***Tau***: Time constant of relaxation, ***Ped***: End diastolic pressure, ***Pes***: End systolic pressure, ***CT***: Contraction time, ***RT***: Relaxation time, ***BW***: Body weight, ***HW***: Heart weight, ***TVW***: Total ventricular weight, ***IW***: Infarcted zone weight.

Discussion complémentaire et perspectives

Une inactivation des NRSF (neuron restrictive silencer factor) cardiaques peut causer une cardiomyopathie dilatée, accompagné par une augmentation de l'expression de la sous-unité Cav3.2 dans les cellules ventriculaires, et conduit à une vulnérabilité accrue aux arythmies et à la mort subite (Kuwahara et al., 2003). Les auteurs ont conclu que NRSF est un régulateur essentiel de la transcription et contribue au maintien du phénotype mature normal des myocytes cardiaques en contrôlant l'expression de plusieurs gènes normalement exprimés au stade fœtal, y compris la sous-unité Cav3.2. Dans notre étude, les souris Cav3.1-/- ne présentent pas de compensation par la sous-unité Cav3.2 à l'état de base et post IDM. Donc, les courants calciques de type T enregistrées chez les souris sauvages correspondent aux Cav3.1. Quatre semaines post IDM, l'amplitude de I_{CaL} est diminuée par rapport à l'état de base, tandis que celle de I_{CaT} est augmentée chez les souris sauvages. L'absence de Cav3.1 augmente le risque de développement de TV induite par stimulation ventriculaire programmée. Une image générale du rôle physiologique de I_{CaT} dans le couplage excitation-contraction a émergé dans un rapport récent de Jaleel et al. (2008). En utilisant une lignée de souris présentant une surexpression conditionnelle spécifique cardiaque de Cav3.1, ces auteurs ont montré que l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} via les canaux calciques de type T (Cav3.1) induisait une augmentation légère de la contractilité cardiaque, sans anomalie histopathologique ou de décès prématuré. Ces résultats contrastent avec l'augmentation d'influx de Ca^{2+} à travers le canal calcique de type L secondaire à une surexpression de la sous-unité β2a. Les auteurs ont suggéré que les canaux Ca^{2+} de type T et de type L sont distribués dans différentes parties du sarcolemme (la surface membranaire par rapport aux tubules T) et que l'influx calcique à travers ces canaux peut induire des effets différents sur la contractilité des cardiomyocytes (Jaleel et al., 2008). Récemment, Chiang et al. (2009) ont montré que Cav3.2 joue un rôle essentiel dans l'activation du processus de l'hypertrophie cardiaque. Ils ont montré que l'hypertrophie induite par la surcharge de pression est supprimée chez les souris déficientes en Cav3.2 (Cav3.2-/-), mais pas chez les souris déficientes en Cav3.1. L'angiotensine II induit une hypertrophie cardiaque qui est également supprimée chez la souris Cav3.2-/-. Il est bien connu que la Ca^{2+}/calmoduline sérine/thréonine phosphatase protéine calcineurine joue un rôle central

dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Une concentration intracellulaire élevée en Ca^{2+} induit une accumulation de NFAT déphosphorylé dans le cytoplasme, ce qui induit la translocation de NFAT cytoplasmique au noyau. Chiang et al. (2009) ont montré que Cav3.2 est un candidat pour les voies de signalisation d'entrée anormale de calcium. En fait, l'activation de NFAT est atténuée dans le ventricule gauche chez les souris Cav3.2-/- suite à une surcharge de pression. Toutes ces constatations suggèrent un rôle différencié du canal calcique de type T dans la voie de signalisation dépendante du Ca^{2+} dans les myocytes cardiaques. L'entrée de calcium dans le cytoplasme peut être plus efficace par le canal calcique de type T que le canal calcique de type L (Nilius et al., 2006; Vassort et al., 2006; Jaleel et al., 2008). En conclusion, notre étude a contribué à éclairer le rôle important du courant I_{CaT} dans la physiologie ainsi que dans le remodelage cardiaque post IDM. L'absence de I_{CaT} augmente le risque de tachycardie ventriculaire post IDM.

V. L'absence de la protéine ILK (Integrin Linked Kinase) cause des arythmies ventriculaires spontanées sévères chez un modèle de souris KO-ILK.

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (MEC) se fait grâce à une activation de récepteurs qui appartiennent principalement à la famille des intégrines, des molécules transmembranaires d'adhésion cellulaire. Les changements de conformation au sein de la structure des intégrines et les interactions avec des molécules de signalisation en aval facilitent la formation de complexes multi-protéiques membranaires connue sous le nom de points focaux d'adhésion (Hynes 2002, Legate et al. 2009). Les intégrines n'ont pas d'activité catalytique et s'appuient donc sur les protéines kinases cytoplasmiques pour la médiation des signaux afin de contrôler une grande variété de fonctions cellulaires. Une protéine importante associée aux intégrines, qui joue un rôle clé pour relier les intégrines au cytosquelette d'actine, est la kinase liée aux intégrines (ILK), un point de connexion aux intégrines membranaires.

Le complexe ILK/Pinch/Parvin est une plate-forme de structure qui relie les récepteurs transmembranaires des intégrines avec l'actine du cytosquelette. Ce complexe participe à des événements de transduction du signal impliqués dans le contrôle des processus physiologiques de la cellule, y compris l'adhésion, la diffusion, la polarité, et la survie ou la migration (Legate et al., 2006).

La dysplasie arythmogène ventriculaire droite (DAVD) a été ajoutée à la définition de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et dans la Classification des cardiomyopathies en 1995. Quatre étapes ont été documentées dans l'histoire naturelle de la DAVD : (i) une phase initiale dissimulée, (ii) la manifestation d'un trouble électrique, (iii) une défaillance cardiaque isolée à droite, et (iv) une insuffisance de la pompe biventriculaire (Sen-Chowdhry et al., 2007). Il existe deux autres formes de DAVD : la cardiomyopathie arythmogène ventriculaire gauche (la fonction du ventricule droit est préservée) et la cardiomyopathie arythmogène biventriculaire (Sen-Chowdhry et al., 2008).

Des mutations dans le gène codant pour l'expression de la protéine kinase liée aux intégrines (ILK) ont été identifiées chez des patients présentant une cardiomyopathie sévère (Knöll et al., 2007). Dans cette étude, nous avons analysé le processus de

remodelage cardiaque ainsi que la susceptibilité aux arythmies d'un modèle murin présentant un « knock-out » cardiospécifique pour cette protéine (KO-ILK). Les résultats de cette étude ont été présentés lors du congrès de l'AHA en 2009.

Résultats

A. Insuffisance cardiaque chez les souris KO-ILK

Nous avons utilisé la méthode de transgénèse ciblée conditionnelle afin d'invalider l'expression du gène d'ILK dans le cœur de souris. De ce fait, nous avons croisé deux lignées de souris différentes : la première lignée (ILK^{fl}) est obtenue par une recombinaison homologue et contient le gène Flox (LoxP1-flanqué d'ILK ; Terpstra et al., 2003) ; la deuxième lignée de souris est obtenue par transgénèse additionnelle et exprime la recombinase Cre (sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase musculaire – MCK ; Wang et al., 1999). La naissance des souris hétérozygotes pour la mutation forme la génération F1 ($ILK^{fl+/-}$, Cre^{+}). Le croisement entre les souris F1 hétérozygotes permet d'obtenir, selon la transmission mendélienne, des souris hétérozygotes ($ILK^{fl+/-}$, Cre^{+}), des souris homozygotes pour le type sauvage ($ILK^{fl-/-}$, Cre^{-}), des souris knockout (KO-ILK : $ILK^{fl+/+}$, Cre^{+}) et des souris contrôles (Ctrl, $ILK^{fl-/-}$, Cre^{+}). Dans cette étude, nous avons étudié les souris KO-ILK en comparaison avec les souris contrôles (Ctrl) des mêmes fratries. Le génotypage des souris est réalisé par PCR à partir de l'ADN caudal de chaque animal.

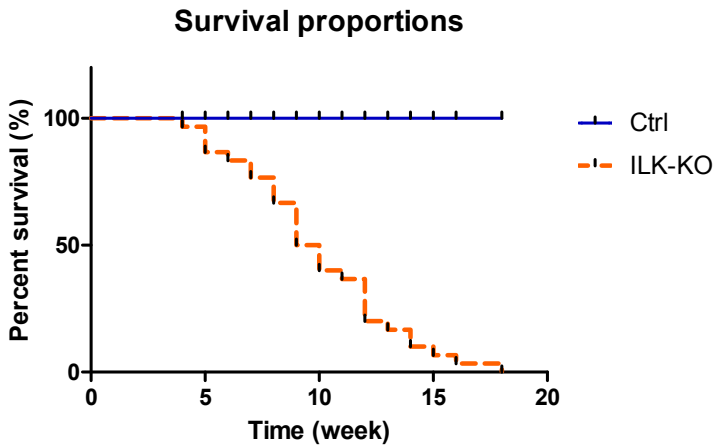

Figure 46 : *Courbe de survie des souris sur 20 semaines après la naissance. Les souris KO-ILK meurent à partir de 4 semaines avec une valeur médiane à l'âge de 10 semaines (n = 30 pour chaque groupe).*

En dépit de l'excision efficace d'ILK dans le muscle squelettique, il n'y a pas de preuve des défauts du muscle squelettique, tant en termes de force des pattes que de l'analyse du muscle en histologie chez les souris KO-ILK. Toutefois, même si le comportement global et la taille des souris KO-ILK étaient impossibles à distinguer aux souris contrôles, nous avons constaté qu'il y a un taux de mortalité important chez les souris KO-ILK à partir de l'âge de 4 semaines (figure 46).

Le cœur des souris KO-ILK est dilaté et le rapport de poids du cœur/poids du corps (TVW/BW) est augmenté signicativement chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles (figure 47). Conformément à l'augmentation globale de la taille, les coupes longitudinales du cœur des souris KO-ILK ont révélé de façon spectaculaire une dilatation du ventricule gauche et de l'oreillette gauche avec un développement de fibrose. Le ventricule droit et l'oreillette droite ne sont pas affectées (figure 48). La fibrose est plus importante dans la partie supérieure que la partie inférieure de la paroi libre du ventricule gauche et du septum interventriculaire. Il n'y a pas d'augmentation significative de la fibrose dans l'oreillette droite et le ventricule droit (figure 49).

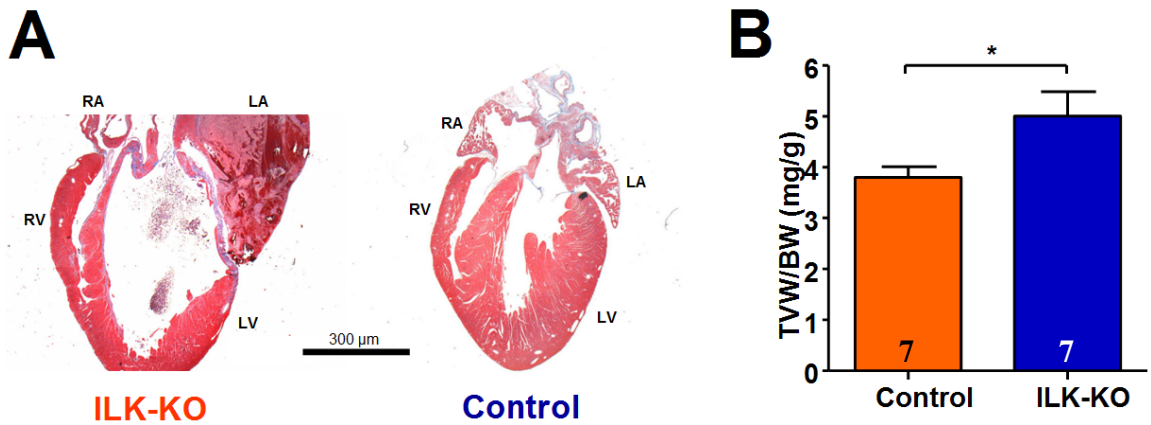

Figure 47 : *A : Coupes longitudinales des 4 chambres du cœur avec une coloration au Trichrome de Masson d'un cœur de souris KO-ILK (à gauche) et d'un cœur de souris contrôle (à droite). L'oreillette gauche et le ventricule gauche sont dilatés avec une augmentation de la fibrose et la présence de caillots sanguins dans l'oreillette gauche chez la souris KO-ILK. B : Le rapport de*

poids du cœur/poids du corps est augmenté significativement chez les souris KO-ILK (p<0.05). RA : l'oreillette droite, RV : le ventricule droit, LA : l'oreillette gauche, LV : le ventricule gauche.*

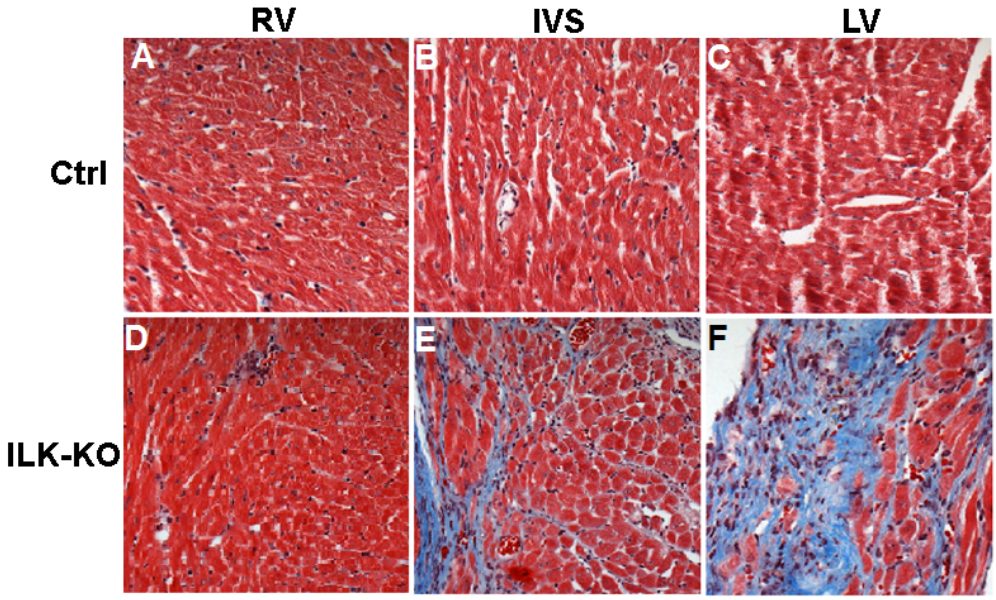

Figure 48 : *A : Coupes histologiques marquées au trichrome de Masson. La distribution de la fibrose est augmentée fortement dans le ventricule gauche (F) et le septum interventriculaire (E) chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles (C, B, respectivement). Il n'y a pas de différence au niveau ventriculaire droit entre les souris KO-ILK (D) et les souris contrôles (A). RV : ventricule droit, IVS : septum interventriculaire et LV : ventricule gauche.*

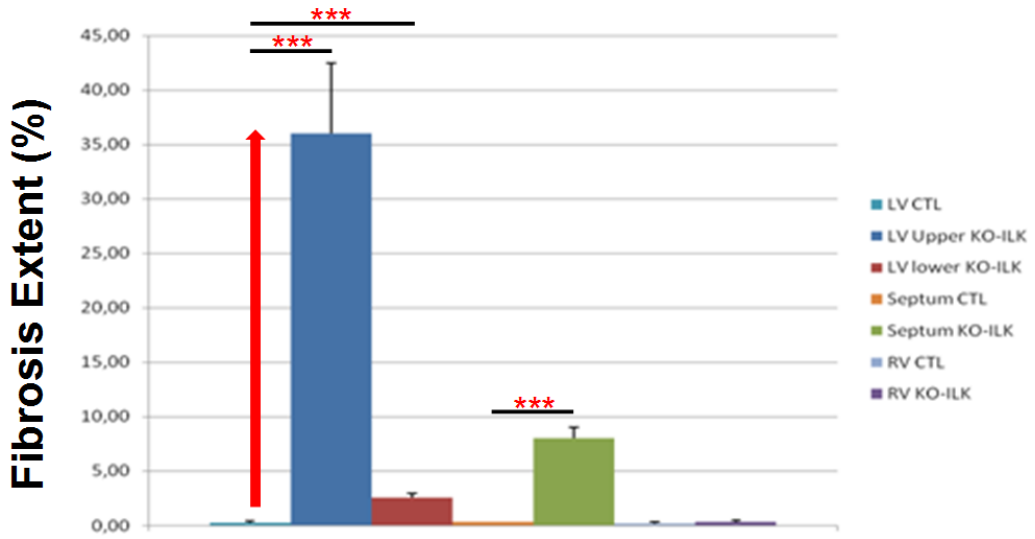

Figure 49 : *Distribution de la fibrose au niveau ventriculaire. Chez les souris KO-ILK, la fibrose est augmentée de façon spectaculaire dans la partie supérieure de la paroi libre du ventricule gauche (LV Upper) et dans le septum interventriculaire par rapport aux souris contrôles (LV CTL, Septum CTL). Il n'y a pas d'évidence de fibrose dans le ventricule droit des souris KO-ILK (RV KO-ILK) par rapport aux souris contrôles (RV CTL), *** p<0.001.*

L'analyse par immunofluorescence a montré qu'il existait une altération au niveau du disque intercalaire des parties supérieures de la paroi libre du ventricule gauche et du septum interventriculaire ; nous avons constaté une diminution significative de la connexine 43 et une augmentation de la N-cadhérine chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles (figure 50).

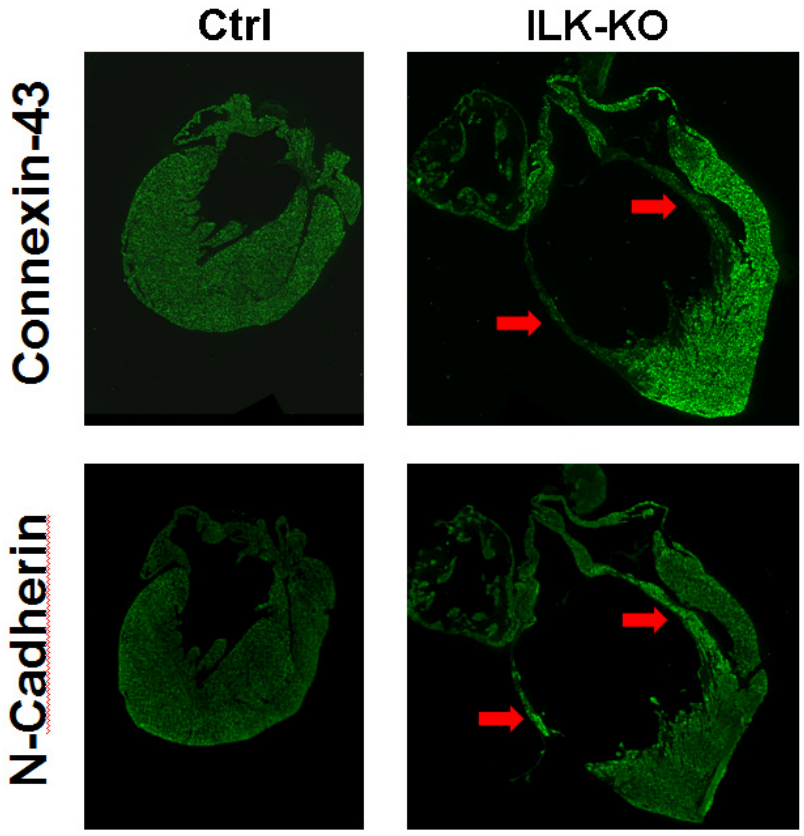

Figure 50 : *Immunomarquage de coupes longitudinales de cœurs d'une souris contrôle (à gauche) et d'une souris KO-ILK (à droite). Les flèches rouges montrent la diminution de la connexine 43 et l'augmentation de la N-cadhérine aux parties supérieures de la paroi libre du ventricule gauche et du septum interventriculaire.*

Les analyses par échocardiographie (tableau 1) ont montré qu'il y a une dilatation du ventricule gauche (augmentation de LVDd) et de l'oreillette gauche chez la souris KO-ILK. La dimension du ventricule droit reste inchangée par rapport aux souris sauvages. Il y a une dysfonction de la contractilité en systole caractérisée par une diminution de la fraction de raccourcissement (FS) et du débit cardiaque, ainsi qu'en diastole, avec une diminution de la valeur de s/d waves et augmentation du temps de relaxation isovolumique corrigée chez les souris KO-ILK.

Echo.	LVDd (mm)	RVDd (mm)	LA/systolic dimension (mm)	FS (%)	CO (ml/min)	S/D waves	IVRTc
Control	3.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	38.8 ± 2.3	14.3 ± 0.5	0.56 ± 0.07	0.94 ± 0.16
ILK-KO	4.6 ± 0.1**	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1**	23.0 ± 2.7**	11.6 ± 0.7**	0.27 ± 0.04*	1.48 ± 0.15*

Tableau 1 : *Paramètres échocardiographiques des souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles. LVDd : diamètre télédiastolique du ventricule gauche ; RVDd : diamètre télédiastolique du ventricule droit; LA : oreillette gauche ; FS : fraction de raccourcissement ; CO : débit cardiaque; S/D waves : le taux de l'onde du flux veineuse pulmonaire en systole (s)/diastole (d) ; IVRTc : temps de relaxation isovolumique corrigée par la fréquence cardiaque. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ($n = 10$ souris contrôles et $n = 8$ souris KO-ILK).*

B. Le remodelage électrique et la survenue des arythmies

L'enregistrement de l'ECG de surface (figure 51) a montré une augmentation significative de la fréquence cardiaque, d'un délai important dans la conduction intraventriculaire et d'une prolongation de la phase de repolarisation ventriculaire chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles (RR = 119 ± *4* ms vs 131 ± *3* ms, QRS = 16 ± *1* ms vs 12 ± *1* ms, QTc = 64 ± *3* ms vs 45 ± *1* ms, respectivement; $p<0.05$, n = 10 pour chaque groupe).

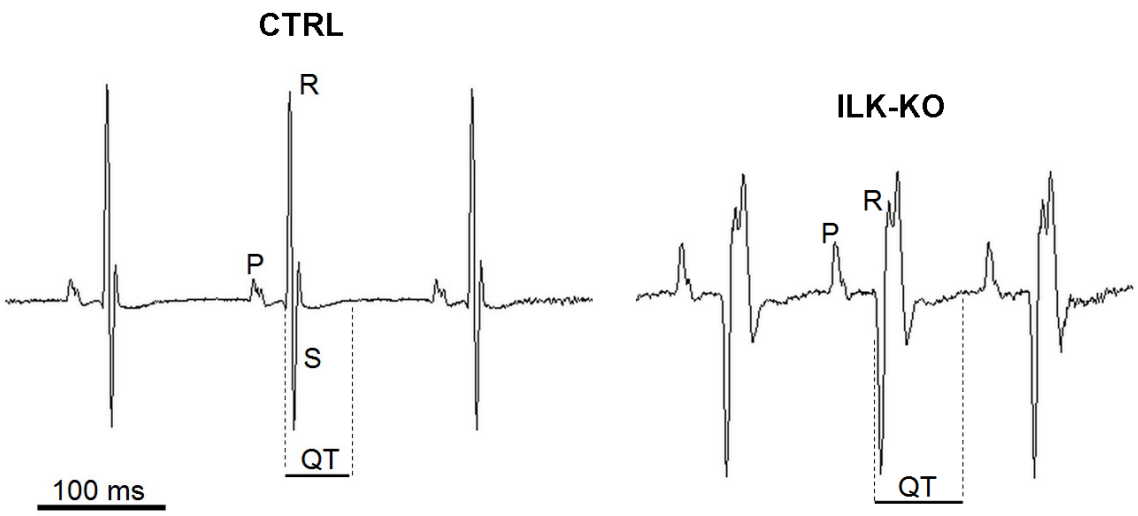

Figure 51 **:** *Tracés d'ECG de surface obtenus chez une souris contrôle (à gauche) et une souris KO-ILK (à droite).*

L'exploration électrophysiologique endocavitaire a montré que la période réfractaire effective ventriculaire (PREV) est augmentée chez les souris KO-ILK (figure 52). Il n'y a pas de différence entre les souris KO-ILK et les souris contrôles en ce qui concerne les autres valeurs comme la période réfractaire effective auriculaire, le temps de conduction sino-atriale, le temps de récupération sinusale, le point de Wenckebach. De façon intéressante, la tachycardie ventriculaire induite par la stimulation ventriculaire programmée est plus fréquente chez les souris KO-ILK (6/7 souris) par rapport aux souris contrôles (0/8 souris, $p<0.05$, figure 52 et 53).

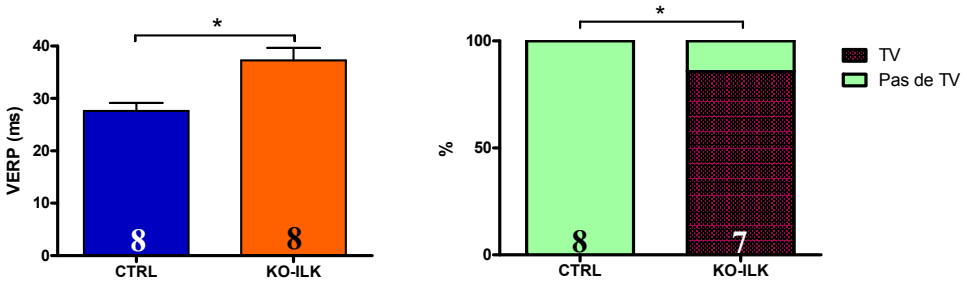

Figure 52 **:** *A gauche : la période réfractaire effective ventriculaire (VERP) est prolongée chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles. A droite : le pourcentage de souris avec tachycardie ventriculaire induite par la stimulation ventriculaire programmée est plus élevé chez les souris KO-ILK que chez les souris contrôles (* $p<0.05$).*

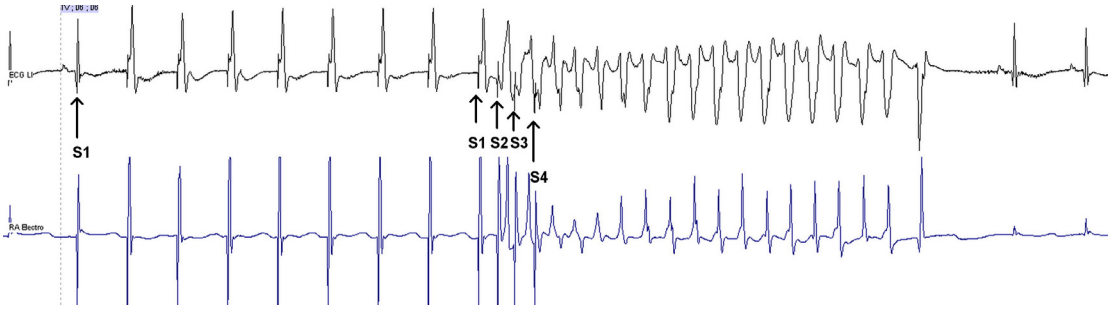

Figure 53 **:** *Illustration de la tachycardie ventriculaire induite par la stimulation endocavitaire programmée chez une souris KO-ILK (S1-S1 = 100 ms).*

L'enregistrement de l'ECG (dérivation D1) en continu par télémétrie a montré qu'il y a une augmentation significative de la prévalence d'extrasystoles ventriculaires (1362 ± *669* ESV/h) et de tachycardies ventriculaires spontanées (5/8 souris) chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles (ni ESV, ni TV sur 7 souris, $p<0.05$).

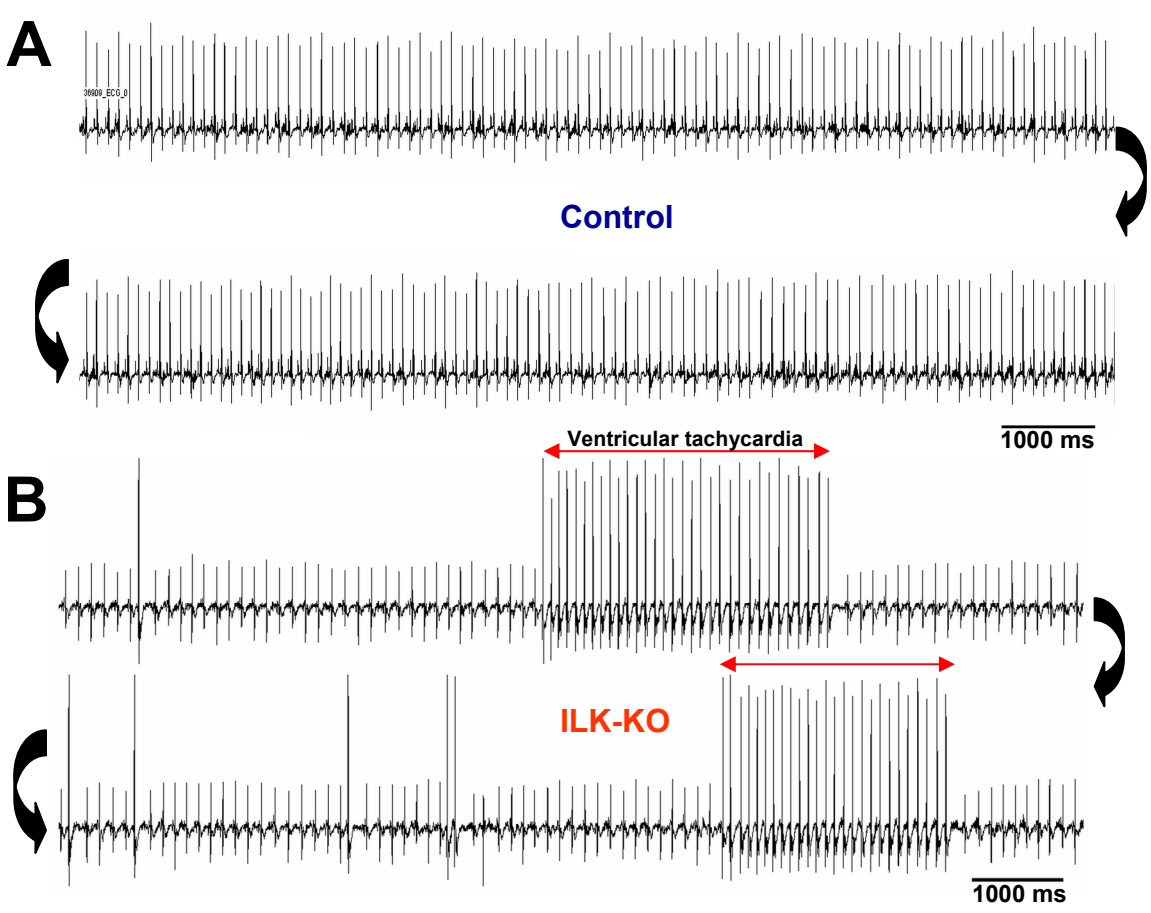

Figure 54 : *Illustration des extrasystoles ventriculaires et de la tachycardie ventriculaire spontanée enregistrée par télémétrie chez une souris KO-ILK (B) et une souris contrôle (A).*

La durée du potentiel d'action du ventricule gauche est prolongée chez les souris KO-ILK en comparaison avec les souris contrôles (APD90 = 76 ± *3* vs 35 ± *1* ms, APD50 = 20 ± *1* vs 4 ± *0* ms, p<0.001 ; figure 55). De plus, des post-dépolarisations précoces (EAD, figure 56) sont enregistrées plus fréquemment chez les souris KO-ILK (3/6) que chez les souris contrôles (0/6, p>0.05).

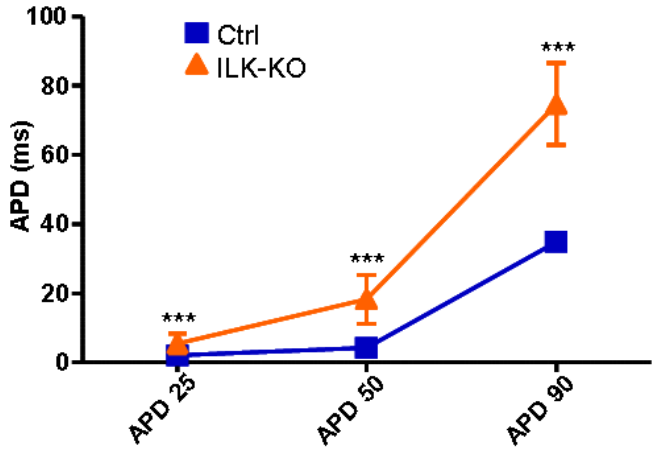

Figure 55 : *Durée du potentiel d'action (APD) enregistré dans la paroi libre du ventricule gauche. Il y a une augmentation significative de l'APD25, de l'APD50 et de l'APD90 chez les souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles.*

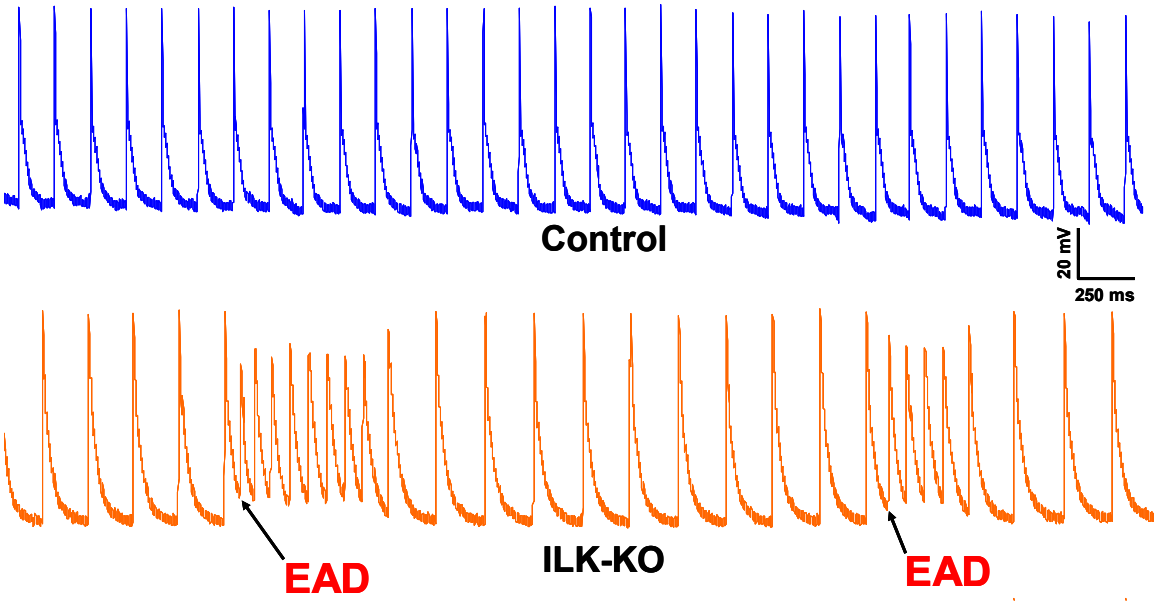

Figure 56 *: Tracés représentatifs d'épisodes d'EAD dans le ventricule gauche d'une souris KO-ILK (les flèches du tracé en bas). Aucune EAD n'a été enregistrée chez les souris contrôles (exemple de tracé en haut).*

Discussion, conclusion et perspectives

La cardiomyopathie dilatée est caractérisée par une dilatation du VG associée à une anomalie de la contractilité ventriculaire. Cette pathologie est associée à un taux élevé de morts subites dues à des arythmies ventriculaires et à un taux de mortalité de 15 à 50% à cinq ans. Parmi les facteurs arythmogènes des cardiomyopathies ventriculaires (avec ou sans défaillance cardiaque), on retrouve l'hétérogénéité de la durée des potentiels d'action ventriculaires, qui constitue un facteur de risque majeur de mort subite (Marban, 1999). L'association entre l'insuffisance cardiaque et la mort subite suggère un défaut de régulation des voies de signalisation ainsi que des défauts dans la transition entre les cardiomyocytes ventriculaires et les cellules du système de conduction (fibres de Purkinje par exemple - Chien, 2000).

La modulation de la voie de signalisation de la kinase liée aux intégrines (Integrin Linked Kinase - ILK) est utilisée pour améliorer le processus de remodelage associé à une large gamme de maladies cardiaques. La kinase liée aux intégrines joue un rôle important dans la régulation de la survie cellulaire, du cycle cellulaire, de l'adhésion, de la prolifération, de la forme cellulaire et de l'accumulation de matrice extracellulaire (Dedhar, 2000). Notre étude a montré que la suppression d'ILK dans le cœur de souris (modèle KO-ILK) est la cause de cardiomyopathie dilatée et de mort subite cardiaque assez tôt dans la vie de l'animal (dès 6 semaines – White et al., 2006). Cependant, le mécanisme de la mort subite n'est pas encore éclairci, bien que cette protéine kinase puisse être impliquée dans l'altération de la conduction cardiaque.

Les résultats actuels montrent qu'il y a une altération de la conduction cardiaque (QRS plus large) et une prolongation de la repolarisation ventriculaire chez la souris KO-ILK par rapport aux souris contrôles. Ces mécanismes participent à la survenue d'arythmies ventriculaires spontanées (nombreuses extrasystoles et épisodes de tachycardie ventriculaire en télémétrie). Les échocardiographies montrent que l'absence d'ILK, un mécano-transducteur entre la sous-unité β1-intégrine et la machinerie du pont

d'acto-myosine, conduit à une dysfonction systolique et diastolique (la fibrose joue un rôle important dans cette altération). La cause de la mort subite de ce modèle est due aux arythmies ventriculaires et à la défaillance cardiaque. Van Rijen et al. (2004) ont montré que l'invalidation cardiaque spécifique du gène codant pour la connexine 43 (KO-Cx43) est suffisante pour ralentir la vitesse de conduction du myocarde et induire un bloc unidirectionnel qui entraîne un substrat arythmogène et la mort subite cardiaque chez la souris KO-Cx43. Dans un modèle de surcharge de pression chez le cobaye, la β-caténine (la plakoglobine) est redistribuée à partir de la membrane plasmique vers le cytoplasme, mais il n'y a aucun changement pour la N-cadhérine (Wang et al., 1999). Dans la maladie de Naxos chez l'Homme, la plakoglobine est tronquée en C-terminal et ne s'associe pas aux disques intercalaires et l'expression de Cx43 est réduite dans le cœur, l'expression de la N-cadhérine semble normale (Kaplan et al., 2004). Une étude chez les souris haplo-insuffisantes pour la N-cadhérine a montré qu'une perturbation de la fonction de la N-cadhérine peut conduire à une altération des jonctions gap et générer ainsi un substrat arythmogène (Li et al., 2008). De façon intéressante, l'absence d'ILK est la cause d'un processus de remodelage important comprenant d'une part, une latéralisation et une diminution des connexines 43 au niveau du disque intercalaire (ce qui joue un rôle important dans la communication intercellulaire), et d'autre part, une augmentation de l'expression de la N-cadhérine. Ces changements du complexe N-cadherine/Cx43 peuvent contribuer à la dysfonction cardiaque et la survenue des troubles du rythme cardiaque.

La fonction majeure de ILK est sa contribution importante dans l'organisation de l'actine du cytosquelette. De ce fait, elle recrute les autres protéines de liaison avec l'actine telles que le complexe de PINCH-parvin, la paxilline, la kindline (Legate et al., 2006). De plus, elle participe à la phosphorylation de protéines comme la GSK-3β et l'AKT/PKB, qui sont importantes pour l'homéostasie et la régénération du muscle (Glass, 2003; Hoffman and Nader, 2004). Cependant, l'activité d'AKT/PKB est cruciale dans la croissance et la fonction contractile normale des cardiomyocytes (DeBosch et al., 2006). L'étude récente de Wang et al., en 2008, en utilisant un modèle murin KO-ILK spécifique du muscle squelettique, a montré que ILK protège les myofibres lors d'un stress musculaire important (exercice musculaire sur un tapis roulant). Dans notre modèle

KO-ILK cardiaque spécifique, nous n'avons pas constaté de dysfonction du muscle squelettique chez les souris KO-ILK. Cependant, ILK protège le cœur en condition de stress physiologique normal. Les souris KO-ILK possèdent une désagrégation des cardiomyocytes adjacents dans le tissu cardiaque et une réduction de la phosphorylation de la sérine 473 de l'Akt, qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines dans l'hypertrophie cardiaque consécutive à une surcharge de travail (Proud, 2004).

Les parties supérieures de la paroi libre du ventricule gauche et du septum interventriculaire subissent un stress pariétal en systole plus fort que les autres parties du cœur. Par conséquent, le remodelage y est plus important (augmentation de la fibrose et dilatation de la paroi, figures 46 et 47). Les souris transgéniques surexprimant ILK spécifiquement dans le cœur présentent une hypertrophie ventriculaire gauche compensée. En revanche, les souris surexprimant une isoforme dominante-négative spécifique d'ILK n'ont pas de réponse hypertrophique compensatoire au traitement chronique avec l'angiotensine II. Chez l'Homme, il y a une augmentation de l'expression de la protéine ILK dans les tissus cardiaques chez les patients atteints une cardiomyopathie hypertrophique à cause de la surcharge de pression (Lu et al., 2006).

Les analyses de l'expression des canaux ioniques (le TLDA et le western blot) sont en cours de réalisation afin de déterminer de façon plus précise la cause de l'altération de l'APD et la survenue des arythmies ventriculaires chez les souris KO-ILK.

Ces résultats témoignent qu'ILK joue un rôle important dans la maintenance de la structure ainsi que la performance cardiaque normale. Par conséquent, l'absence d'ILK dans le cœur est une cause de cardiomyopathie dilatée associée à l'apparition de troubles du rythme ventriculaire spontanés sévères, des traits semblables à la dysplasie arythmogène ventriculaire gauche (la fonction du ventricule droit préservée) (Sen-Chowdhry et al., 2008). Cependant, ce modèle des souris KO-ILK se distingue tout de même des autres types de cardiomyopathie par de fortes infiltrations adipocytaires, ce qu'on n'a pas constaté chez les souris KO-ILK.

En utilisant un adénovirus dans un modèle de rat post IDM, Ding et al. (2009) ont montré que la surexpression d'ILK peut atténuer le remodelage du myocarde et améliorer la fonction cardiaque post IDM.

En conclusion, cette étude pourrait apporter des connaissances fondamentales pour un traitement précoce ou préventif afin de diminuer le remodelage cardiaque (post IDM par exemple) ou pour obtenir un effet anti-arythmique (par surexpression d'ILK par thérapie génique par exemple).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adamantidis MM, Caron JF, Dupuis BA. Triggered activity induced by combined mild hypoxia and acidosis in guinea pig Purkinje fibers. J Mol Cell Cardiol 1986;18:1287–1299.

Adamson PB, Barr RC, Callans DJ, Chen PS, Lathrop DA, Makielski JC, Nerbonne JM, Nuss HB, Olgin JE, Przywara DA, Rosen MR, Rozanski GJ, Spach MS, Yamada KA. The perplexing complexity of cardiac arrhythmias: beyond electrical remodeling. Heart Rhythm. 2005 Jun; 2(6):650-9.

Ahmmed GU, Dong PH, Song G, et al. Changes in Ca(2+) cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. Circ Res 2000;86:558–570.

Aiba T, Tomaselli GF. Electrical remodeling in the failing heart. Curr Opin Cardiol. 2010 Jan;25(1):29-36.

Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. Nucleic Acids Res. 1997 May 1;25(9):1766-73.

Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural heterogeneities of cellular repolarization underlie polymorphic ventricular tachycardia in failing myocardium. Circulation 2001;104:25.

Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. Circ Res. 2004 Oct 1;95(7):717-25.

Alt E, Matula M, Theres H, Heinz M, Baker R. The basis for activity controlled rate variable cardiac pacemakers: an analysis of mechanical forces on the human body induced by exercise and environment. Pacing Clin Electrophysiol. 1989;12:1667–1680.

Antzelevitch C, Burashnikov A, Di Diego JM. Cellular and ionic mechanisms underlying arrhythmogenesis. In: Gussak, I. (Ed.), Cardiac Repolarization: Bridging Basic and Clinical Science. 2003. Humana Press, Totowa, NJ, p. 548.

Antzelevitch C, Moe GK. Electrotonic inhibition and summation of impulse conduction in mammalian Purkinje fibers. Am J Physiol. 1983 Jul;245(1):H42-53.

Antzelevitch C, Moe GK. Electrotonically-mediated delayed conduction and reentry in relation to "slow responses" in mammalian ventricular conducting tissue. Circ Res 1981;49:1129–1139.

Antzelevitch C, Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. J Am Coll Cardiol. 1994.

Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. Circ Res 1993;72:463–469.

Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marban E, Tomaselli GF. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. Pharmacol Ther. 2001 Nov-Dec;92(2-3):213-30. Review.

Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, Basso C, Thiene G, Tsatsopoulou A, Protonotarios N, McKenna WJ, Calkins H, Saffitz JE. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. N Engl J Med. 2009 Mar 12;360(11):1075-84.

Aubin MC, Cardin S, Comtois P, Clement R, Gosselin H, Gillis MA, Le Quang K, Nattel S, Perrault LP, Calderone A. A high-fat diet increases risk of ventricular arrhythmia in female rats: enhanced arrhythmic risk in the absence of obesity or hyperlipidemia. J Appl Physiol. 2010 Feb 4.

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.

Bailly P, Bénitah JP, Mouchonière M, Vassort G, Lorente P. Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. Circulation. 1997 Aug 19;96(4):1266-74.

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 Oct 15;552(Pt 2):535-46.

Barr CS, Naas A, Freeman M, Lang CC, Struthers AD. QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure. Lancet 1994;343:327–329.

Basso C, Corrado D, Thiene G. Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. Cardiol Rev. 1999 May-Jun;7(3):127-35.

Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompré AM. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca2(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. Circ Res. 1990 Feb;66(2):554-64.

Bendig G, Grimmler M, Huttner IG, Wessels G, Dahme T, Just S, Trano N, Katus HA, Fishman MC, Rottbauer W. Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. Gen Dev. 2006;20:2361–2372.

Bénitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C, Lorente P. Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. J Physiol. 1993 Sep;469:111-38.

Benson DW, Wang DW, Dyment 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 Oct;112(7):1019-28.

Berger RD, Kasper EK, Baughman KL, Marban E, Calkins H, Tomaselli GF. Beat-to-beat QT interval variability: novel evidence for repolarization lability in ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. Circulation 1997;96:1557–1565.

Bernstein SA, Morley GE. Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. Adv Cardiol. 2006;42:71-85.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):198-205.

Bers DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. Circ Res. 2002 Jan 11;90(1):14-7.

Bers DM, Despa S. Na/K-ATPase--an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. Trends Cardiovasc Med. 2009 May;19(4):111-8.

Berul CI. Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. Physiol Genomics. 2003 May 13;13(3):207-16.

Berul CI and Wang PJ. In vivo electrophysiologic studies in mice. In : Cardiovascular Physiology in the Genetically Engineered Mouse (2nd ed.), edited by Hoit BD and Walsh RA. Boston : Kluwer Academic, p.237 – 256, 2001.

Berul CI, Aronovitz MJ, Wang PJ, Mendelsohn ME. In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. Circulation 94: 2641–2648, 1996.

Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, and Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in α-MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. J Clin Invest 99: 570–576, 1997.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. Physiol Rev. 2009 Jul;89(3):847-85.

Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. Trends Cardiovasc Med 12: 206–212, 2002.

Binah O, Arieli R, Beck R, Rosen MR, and Palti Y. Ventricular electrophysiological properties: is interspecies variability related to thyroid state? Am J Physiol Heart Circ Physiol 252: H1265–H1274, 1987.

Bleeker WK, Mackaay AJ, Masson-Pévet M, Op't Hof T, Jongsma HJ, Bouman LN. Asymmetry of the sino-atrial conduction in the rabbit heart. J Mol Cell Cardiol. 1982 Nov;14(11):633-43.

Blom NA, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Poelmann RE, Mentink MM, Ottenkamp J. Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression: possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. Circulation. 1999 Feb 16;99(6):800-6.

Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. Nature. 2004;432:466–472.

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* 88: 1254–1258, 2001.

Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. FEBS Lett 2000;481:73–6.

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 Jun;118(4):1051-7.

Bois P, Guinamard R, Chemaly AE, Faivre JF, Bescond J. Molecular regulation and pharmacology of pacemaker channels. Curr Pharm Des. 2007;13(23):2338-49. Review.

Bois P, Lenfant J. Isolated cells of the frog sinus venosus: properties of the inward current activated during hyperpolarization. Pflugers Arch. 1990 May;416(3):339-46.

Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. Cardiovasc Res. 1998 May;38(2):441-50.

Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. Cardiovasc Res. 2000 Sep;47(4):658-87.

Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, Lee LA, Provost TT, Reichlin M, Rider L, Rupel A, Saleeb S, Weston WL, Skovron ML. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. J Am Coll Cardiol. 1998 Jun;31(7):1658-66.

Brachmann J, Scherlag BJ, Rosenshtraukh LV, Lazzara R. Bradycardia-dependent triggered activity: Relevance to drug-induced multiform ventricular tachycardia. Circulation 1983;68:846–856.

Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Lembo G. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. Nat Med. 2003; 9: 68–75.

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? Nature. 1979 Jul 19;280(5719):235-6.

Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. J Hyperten 1993;11:611–622.

Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G. Regional differences in electrical and mechanical properties of myocytes from guinea-pig hearts with mild left ventricular hypertrophy. Cardiovasc Res 1997;35: 315–323.

Bucchi A, Plotnikov AN, Shlapakova I, Danilo P Jr, Kryukova Y, Qu J, Lu Z, Liu H, Pan Z, Potapova I, KenKnight B, Girouard S, Cohen IS, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR. Wild-type

and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. Circulation. 2006;114:992–999.

Burashnikov A, Antzelevitch C. Acceleration-induced action potential prolongation and early afterdepolarizations. J Cardiovasc Electrophysiol 1998;9:934–948.

Burashnikov A, Antzelevitch C. Block of IKs does not induce early afterdepolarization activity but promotes β-adrenergic agonist-induced delayed afterdepolarization activity in canine ventricular myocardium. J Cardiovasc Electrophysiol 2000;11:458–465.

Burashnikov A, Antzelevitch C. A prominent IKs in epicardium and endocardium contributes to the development of transmural dispersion of repolarization but protects against the development of early afterdepolarizations. J Cardiovasc Electrophysiol 2002;13.

Cai J, Yi FF, Li YH, Yang XC, Song J, Jiang XJ, Jiang H, Lin GS, Wang W. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with complete atrioventricular block. Life Sci. 2007 Apr 17;80(19):1746-53.

Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. Circulation 1995;92:2385–2390.

Cannell MB, Lederer WJ. The arrhythmogenic current ITI in the absence of electrogenic sodiumcalcium exchange in sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1986;374:201–219.

Carmeliet E. Electrophysiologic and voltage clamp analysis of the effects of sotalol on isolated cardiac muscle and Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 1985;232:817–825.

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 Feb 27;98(5):2526-31.

Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. Cardiovasc Res 1994; 28:1180–1187.

Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current If in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. Circulation 1996;94:1674–1681.

Chameides L, Truex RC, Vetter V, Rashkind WJ, Galioto FM Jr, Noonan JA. Association of maternal systemic lupus erythematosus with congenital complete heart block. N Engl J Med. 1977 Dec 1;297(22):1204-7.

Chen H, Huang XN, Yan W, Chen K, Guo L, Tummalapali L, Dedhar S, St-Arnaud R, Wu C, Sepulveda JL. Role of the integrin-linked kinase/PINCH1/alpha-parvin complex in cardiac myocyte hypertrophy. Lab Invest. 2005;85:1342–1356.

Chen SA, Hsieh MH, Tai CT, Tsai CF, Prakash VS, Yu WC, Hsu TL, Ding YA, Chang MS. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation. Circulation. 1999 Nov 2;100(18):1879-86.

Chen YJ, Tai CT, Hsieh MH, Tsai CF, Lin WS, Chen SA. Dependence of electrogram duration in right posteroseptal atrium and atrium-pulmonary vein junction on pacing site: mechanism and implications regarding atrioventricular nodal reentrant tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 2000 May;11(5):506-15.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. Science. 1993 Oct 29;262(5134):740-4.

Chiang CS, Huang CH, Chieng H, Chang YT, Chang D, Chen JJ, Chen YC, Chen YH, Shin HS, Campbell KP, Chen CC. The Cav3.2 T-type Ca2+ channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. Circ Res. 2009 Feb 27;104(4):522-30.

Chien KR. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):227-32. Review.

Cho HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. J Physiol. 2003 Jul 1;550(Pt 1):169-80.

Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J. Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K+ channels IKr and IKs. Therapie. 2000 Jan-Feb;55(1):195-202.

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 May;286(5):H1757-66.

Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, Franciosa JA, Harston WE, Tristani FE, Dunkman WB, Jacobs W, Francis GS, Flohr KH, et al. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. N Engl J Med. 1986 Jun 12;314(24):1547-52.

Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. Circulation, 1995, 91, 2504-2507.

Collier ML, Thomas AP, Berlin JR. Relationship between L-type Ca2+ current and unitary sarcoplasmic reticulum Ca2+ release events in rat ventricular myocytes. J Physiol. 1999 Apr 1;516 (Pt 1):117-28.

Couette B, Marger L, Nargeot J, Mangoni ME. Physiological and pharmacological insights into the role of ionic channels in cardiac pacemaker activity. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2006 Sep;6(3):169-90.

Coumel P. Cardiac arrhythmias and the autonomic nervous system. J Cardiovasc Electrophysiol. 1993 Jun;4(3):338-55. Review.

Cranefield PF: Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. Circ Res 1977;41:415-23.

Creazzo TL. Reduced L-type calcium current in the embryonic chick heart with persistent truncus arteriosus. Circ Res 1990;66:1491–1498.

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 alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family. Circ Res. 1998 Jul 13;83(1):103-9.

Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. Circ Res. 2004 Nov 12;95(10):1035-41. Epub 2004 Oct 21.

Davidenko JM, Cohen L, Goodrow RJ, Antzelevitch C. Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarizations, and triggered activity in canine Purkinje fibers. Effects of stimulation rate, potassium, and magnesium. Circulation 1989;79:674–686.

Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. J Cardiovasc Electrophysiol. 1995 Oct;6(10 Pt 1):813-22.

De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. J Appl Physiol. 2004 Jun;96(6):2174-8.

De Mello WC. Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. Hypertension 1996;27:1267–1272.

De Mello WC. Impaired regulation of cell communication by beta-adrenergic receptor activation in the failing heart. Hypertension 1996;27:265–268.

De Paoli P, Cerbai E, Koidl B, Kirchengast M, Sartiani L, Mugelli A. Selectivity of different calcium antagonists on T- and L-type calcium currents in guinea-pig ventricular myocytes. Pharmacol Res. 2002 Dec;46(6):491-7.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. Circulation. 2006 May 2;113(17):2097-104.

Demolombe S, Franco D, de Boer P, Kuperschmidt S, Roden D, Pereon Y, Jarry A, Moorman AF, Escande D. Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. Am J Physiol.. 2001; 280: C359–C372.

Dedhar S. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. Curr Opin Cell Biol. 2000 Apr;12(2):250-6. Review.

Denyer JC, Brown HF. Rabbit sino-atrial node cells: isolation and electrophysiological properties. J Physiol. 1990 Sep;428:405-24.

Deroubaix E, Thuringer D, Coulombe A, Mercadier JJ, Coraboeuf E. Dilation and action potential lengthening in cardiomyopathic Syrian hamster heart. Basic Res Cardiol. 1999 Aug;94(4):274-83.

DiFrancesco D. Serious workings of the funny current. Prog Biophys Mol Biol. 2006 Jan-Apr;90(1-3):13-25. Epub 2005 Jun 4.

DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annu Rev Physiol. 1993;55:455-72.

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

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

Ding L, Dong L, Chen X, Zhang L, Xu X, Ferro A, Xu B. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction. Circulation. 2009 Sep 1;120(9):764-73.

Dobrowolski R, Willecke K. Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models. Antioxid Redox Signal. 2009 Feb;11(2):283-95.

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

Dodge SM, Beardslee MA, Darrow BJ, Green KG, Beyer EC, Saffitz JE. Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes. J Am Coll Cardiol 1998;32:800–807.

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. Cardiovasc Res. 1998 Jul;39(1):34-49.

Dokuparti MV, Pamuru PR, Thakkar B, Tanjore RR, Nallari P. Etiopathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. J Hum Genet. 2005;50(8):375-81. Epub 2005 Aug 12.

Dorn GW 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. Circ Res. 2003 Jun 13;92(11):1171-5.

Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, and Barhanin J. Involvement of IsK-associated K+ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Circ Res 83: 95–102, 1998.

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. J Clin Invest. 2000 Jul;106(1):55-62.

Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ. Altered connexin expression in human congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2001 Feb;33(2):359-71.

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 Mar;2(3):173-7.

Egashira K, Nishii K, Nakamura K, Kumai M, Morimoto S, Shibata Y. Conduction abnormality in gap junction protein connexin45-deficient embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004 Oct;280(2):973-9.

Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH. Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. J Cardiovasc Electrophysiol. 2002 Apr;13(4):399-405.

Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. Heart. 2001;86:559 –562.

Fareh S, Bénardeau A, Nattel S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. Cardiovasc Res. 2001 Mar;49(4):762-70.

Farkas A, Leprán I, Papp JG. Proarrhythmic effects of intravenous quinidine, amiodarone, D-sotalol, and almokalant in the anesthetized rabbit model of torsade de pointes. J Cardiovasc Pharmacol. 2002 Feb;39(2):287-97.

Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ. The arrhythmogenic transient inward current Iti and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 1987;392:523–542.

Felipe A, Knittle TJ, Doyle KL, Snyders DJ, Tamkun MM. Differential expression of Isk mRNAs in mouse tissue during development and pregnancy. Am J Physiol.. 1994; 267: C700–C705.

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 May;34(5):533-46.

Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. Circ Res 2003;93:1241–8.

Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. Physiol Rev. 2002 Oct;82(4):893-922.

Flesch M, Schwinger RH, Schnabel P, et al. Sarcoplasmic reticulum Ca2+ATPase and phospholambane mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. J Molec Med 1996;74:321–332.

Fontaine G, Fontaliran F, Hébert JL, Chemla D, Zenati O, Lecarpentier Y, Frank R. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Annu Rev Med. 1999;50:17-35. Review.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. Annu Rev Physiol. 2003;65:45–79.

Furukawa T, Ito H, Nitta J, Tsujino M, Adachi S, Hiroe M, Marumo F, Sawanobori T, Hiraoka M. Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes. Circ Res. 1992 Nov;71(5):1242-53.

Furukawa T, Kimura S, Cuevas J, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Role of cardiac ATPregulated potassium channels in differential responses of endocardial and epicardial cells to ischemia. Circ Res 1991;68:1693–1702.

Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Kimura S, Bassett AL. Metabolic inhibition of ICa,L and IK differs in feline left ventricular hypertrophy. Am J Physiol 1994;266:H1121–H1131.

Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):2012-21.

Gellen B, Fernández-Velasco M, Briec F, Vinet L, LeQuang K, Rouet-Benzineb P, Bénitah JP, Pezet M, Palais G, Pellegrin N, Zhang A, Perrier R, Escoubet B, Marniquet X, Richard S, Jaisser F, Gómez AM, Charpentier F, Mercadier JJ. Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. Circulation. 2008 Apr 8;117(14):1778-86.

Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, and Seidman JG. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. Science 272: 732–734, 1996.

Gilmour RF, Zipes DP. Different electrophysiological responses of canine endocardium and epicardium to combined hyperkalemia, hypoxia, and acidosis. Circ Res 1980;46:814–825.

Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Nat Cell Biol. 2003 Feb;5(2):87-90.

Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. Science. 1997 May 2;276(5313):800-6.

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. Annu Rev Biochem. 1996;65:475-502.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Dec;77(12):7380-4.

Gough WB, Mehra R, Restivo M, Zeiler RH, el-Sherif N. Reentrant ventricular arrhythmias in the late myocardial infarction period in the dog. 13. Correlation of activation and refractory maps. Circ Res. 1985 Sep;57(3):432-42.

Gros D, Dupays L, Alcoléa S, Meysen S, Miquerol L, Théveniau-Ruissy M. Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. Cardiovasc Res. 2004 May 1;62(2):299-308.

Grossman A, Barenboim E, Azaria B, Sherer Y, Goldstein L. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a possible cause of sudden incapacitation. Aviat Space Environ Med. 2004 Aug;75(8):697-9.

Guerrero PA, Schuessler RB, Davis LM, Beyer EC, Johnson CM, Yamada KA, and Saffitz JE. Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. J Clin Invest 99: 1991–1998, 1997.

Guo J, Mitsuiye T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. Pflugers Arch. 1997 Feb;433(4):390-6.

Guo J, Ono K, Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. Physiol. 1995 Feb 15;483 (Pt 1):1-13.

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 Mar 22;90(5):586-93.

Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. Circ Res. 2001 Feb 16;88(3):333-9.

Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. Cardiovasc Res. 2008 Jan 15;77(2):245-55. Epub 2007 Oct 15.

Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Lüderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. Circulation. 1999 Mar 23;99(11):1508-15.

Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. J Gen Physiol. 1975 May;65(5):617-44.

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 Jan;395:233-53.

Hashimoto K. Torsades de pointes liability inter-model comparisons: the experience of the QT PRODACT initiative. Pharmacol Ther. 2008 Aug;119(2):195-8.

Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. N Engl J Med 1998;339:659–666.

Hannigan GE, Coles JG, Dedhar S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. Circ Res. 2007 May 25;100(10):1408-14.

Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. Nat Rev Cancer. 2005;5:51– 63.

Harris DM, Mills GD, Chen X, Kubo H, Berretta RM, Votaw VS, Santana LF, Houser SR. Alterations in early action potential repolarization causes localized failure of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release. Circ Res. 2005 Mar 18;96(5):543-50. Epub 2005 Feb 10.

Hart G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res 1994;28: 933–946.

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na+-Ca2+-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. Circulation. 1999 Feb 9;99(5):641-8.

Hill JA. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. Trends Cardiovasc Med. 2003 Nov;13(8):316-22.

Hirano Y, Fozzard HA, January CT. Characteristics of L- and T-type Ca2+ currents in canine cardiac Purkinje cells. Am J Physiol. 1989 May;256(5 Pt 2):H1478-92.

Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jaïs P, Janse MJ, Haïssaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. Circulation. 2002 May 21;105(20):2442-8.

Hoffman BF, De Carvalho AP, De Mello WC. Transmembrane potentials of single fibres of the atrio-ventricular node. Nature. 1958 Jan 4;181(4601):66-7.

Hoffman EP, Nader GA. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. Nat Med. 2004 Jun;10(6):584-5.

Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. Circulation 1998;97:55–65.

Huang B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of K+ channel genes and currents in the postinfarction heart. J Cardiovasc Electrophysiol. 2000 Nov;11(11):1252-61.

Honjo H, Lei M, Boyett MR, Kodama I. Heterogeneity of 4-aminopyridine-sensitive current in rabbit sinoatrial node cells. Am J Physiol. 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1295-304.

Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. Circulation 1998;97:55–65.

Huang SK. Use of radiofrequency energy for catheter ablation of the endomyocardium : a prospective energy source. J Electrophysiol 1987 ; 1 : 78-91.

Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca2+ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. J Physiol 2000;524:415–22.

Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat Med. 2002 Sep;8(9):918-21.

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

Izumi T, Kihara Y, Sarai N, Yoneda T, Iwanaga Y, Inagaki K, Onozawa Y, Takenaka H, Kita T, Noma A. Reinduction of T-type calcium channels by endothelin-1 in failing hearts in vivo and in adult rat ventricular myocytes in vitro. Circulation. 2003 Nov 18;108(20):2530-5. Epub 2003 Oct 27.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest. 2001 Jun;107(11):1395-402.

Jaïs P, Haïssaguerre M, Shah DC, Chouairi S, Gencel L, Hocini M, Clémenty J. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation. Circulation. 1997 Feb 4;95(3):572-6.

Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002 May;54(2):204-16.

James TN. Morphology of the human atrioventricular node with remarks pertinent to its electrophysiology. Am Heart J 1961;62:756–771.

Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. Cardiovasc Res. 2004 Feb 1;61(2):208-17.

Janse MJ, Van Capelle FJL, Morsink H, et al. Flow of "injury" current and patterns of excitation during early ventricular arrhythmias in acute regional myocardial ischemia in isolated porcine and canine hearts. Evidence for two different arrhythmogenic mechanisms. Circ Res 1980;47:151–167.

January CT, Riddle JM, Salata JJ. A model for early afterdepolarizations: Induction with the Ca2+ channel agonist BAY K 8644. Circ Res 1988;62:563–571.

Jaleel N, Nakayama H, Chen X, Kubo H, MacDonnell S, Zhang H, Berretta R, Robbins J, Cribbs L, Molkentin JD, Houser SR. Ca2+ influx through T- and L-type Ca2+ channels have different effects on myocyte contractility and induce unique cardiac phenotypes. Circ Res. 2008 Nov 7;103(10):1109-19.

Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. Cardiovasc Res 2000;48:34–43.

Jongsma HJ, Wilders R. Gap junctions in cardiovascular disease. Circ Res 2000;86:1193–1197.

Ju YK, Allen DG. How does beta-adrenergic stimulation increase the heart rate? The role of intracellular Ca^{2+} release in amphibian pacemaker cells. *J Physiol* 516: 793–804, 1999.

Ju YK, Allen DG. Intracellular calcium and Na^{+}-Ca^{2+} exchange current in isolated toad pacemaker cells. *J Physiol* 508: 153–166, 1998.

Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. Circulation. 1998 Oct 6;98(14):1383-93.

Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, Squarcioni CP, McKenna WJ, Thiene G, Basso C, Brousse N, Fontaine G, Saffitz JE. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). Heart Rhythm. 2004 May;1(1):3-11.

Kasahara H, Wakimoto H, Liu M, Maguire CT, Converso KL, Shioi T, Huang WY, Manning WJ, Paul D, Lawitts J, Berul CI, and Izumo S. Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing Csx/Nkx2.5 homeodomain mutant protein. J Clin Invest 108: 189–201, 2001.

Katz LN, Pick A. Clinical Electrocardiography. Part 1. The Arrhythmias. Philadelphia: Lea and Febiger, 1956:224–236.

Keith A, Flack M. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. J Anat Physiol 1907;41:172–189.

Keung EC. Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. Circ Res 1989;64:753–763.

Khoo MS, Kannankeril PJ, Li J, Zhang R, Kupershmidt 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 Jun;2(6):634-40.

Kimura J, Noma A, Irisawa H. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. Nature. 1986 Feb 13-19;319(6054):596-7.

Kimura S, Bassett AL, Kohya T, Kozlovskis PL, Myerburg RJ. Simultaneous recording of action potentials from endocardium and epicardium during ischemia in the isolated cat ventricle: Relation of temporal electrophysiologic heterogeneities to arrhythmias. Circulation 1986;74:401–409.

Kimura S, Bassett AL, Furukawa T, Furukawa N, Myerburg RJ. Differences in the effect of metabolic inhibition on action potentials and calcium currents in endocardial and epicardial cells. Circulation 1991;84:768–777.

Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schäfers M, Zellerhoff S, Paul M, Athai T, Hiller KH, Baba HA, Breithardt G, Ruiz P, Wichter T, Levkau B. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. Circulation. 2006 Oct 24;114(17):1799-806. Epub 2006 Oct 9.

Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. Curr Biol. 1998 Feb 26;8(5):299-302.

Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. Am J Physiol 1989;256:H1450–H1461.

Knöll R, Postel R, Wang J, Krätzner R, Hennecke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK, Kube D, Knöll G, Schäfer K, Hayashi T, Holm T, Kimura A, Schork N, Toliat MR, Nürnberg P, Schultheiss HP, Schaper W, Schaper J, Bos E, Den Hertog J, van Eeden FJ, Peters

PJ, Hasenfuss G, Chien KR, Bakkers J. Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. Circulation. 2007 Jul 31;116(5):515-25.

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 Jun;272(6 Pt 2):H2793-806.

Kontogeorgis A, Li X, Kang EY, Feig JE, Ponzio M, Kang G, Kaba RA, Wit AL, Fisher EA, Morley GE, Peters NS, Coetzee WA, Gutstein DE. Decreased connexin43 expression in the mouse heart potentiates pacing-induced remodeling of repolarizing currents. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Nov;295(5):H1905-16.

Korte T, Fuchs M, Guener Z, v Bonin J, de Sousa M, Niehaus M, Tebbenjohanns J, and Drexler H. In-vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. J Interv Card Electrophysiol 6: 121–132, 2002.

Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca2+ channels activating at negative voltages. J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):22100-6.

Koss KL, Ponniah S, Jones WK, Grupp IL, Kranias EG. Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments: molecular and physiological analyses. Circ Res. 1995;77:342-353.

Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. Circ Res. 1996 Dec;79(6):1059-63.

Koumi SI, Martin RL, Sato R. Alterations in ATP-sensitive potassium channel sensitivity to ATP in failing human hearts. Am J Physiol 1997;272:H1656–H1665.

Kovoor P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Gehrmann J, Berul CI, Clapham DE. Evaluation od the role of IKACh in atrial fibrillation using a mouse knockout model. J Am Coll Cardiol. 2001 Jun 15;37(8):2136-43.

Koyama T, Ono K, Watanabe H, Ohba T, Murakami M, Iino K, Ito H. Molecular and electrical remodeling of L- and T-type Ca2+ channels in rat right atrium with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Circ J 2009;73:256–63.

Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K.Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Apr 11;103(15):5959-64.

Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. Development. 2000 Oct;127(19):4179-93.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. Development. 2000 Aug;127(16):3501-12.

Kuo CS, Munakata K, Reddy CP, Surawicz B. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. Circulation. 1983 Jun;67(6):1356-67.

Kupershmidt 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 Feb 5;84(2):146-52.

Kurita T, Ohe T, Marui N, Aihara N, Takaki H, Kamakura S, Matsuhisa M, Shimomura K. Bradycardia-induced abnormal QT prolongation in patients with complete atrioventricular block with torsades de pointes. Am J Cardiol. 1992; 69: 628–633.

Kushnir A, Betzenhauser MJ, Marks AR. Ryanodine receptor studies using genetically engineered mice. FEBS Lett. 2010 May 17;584(10):1956-65.

Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa

Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. EMBO J. 2003 Dec 1;22(23):6310-21.

Lab MJ. Contraction-excitation feedback in myocardium: Physiologic basis and clinical revelance. Circ Res 1982;50:757–766.

Laflamme MA, Becker PL. Ca2+-induced current oscillations in rabbit ventricular myocytes. Circ Res 1996;78:707–716.

Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Measurement of funny current (I(f)) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol 1999;10:947–953.

Lakatta EG. Beyond Bowditch: the convergence of cardiac chronotropy and inotropy. Cell Calcium. 2004 Jun;35(6):629-42.

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 Apr 15;556(Pt 2):481-94.

Lavergne T, Guize L, Bruneval P, Von Euw D, Le Heuzey JY, Peronneau P. Electrocoagulation of the His bundle node junction in dogs by a high-frequency current delivered by suction catheter. Arch Mal Coeur Vaiss. 1989 Jun;82(6):955-62. French.

Lavergne T, Guize L, Le Heuzey JY, Carcone P, Geslin J, Cousin MT. Closed-chest atrioventricular junction ablation by high-frequency energy transcatheter desiccation. Lancet. 1986 Oct 11;2(8511):858-9.

Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez Reyes E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. Biophys J 1999;77:3034–42.

Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jan;7(1):20-31.

Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. Genes Dev. 2009 Feb 15;23(4):397-418.

Lehnart SE, Marks AR. Phosphodiesterase 4D and heart failure: a cautionary tale. Expert Opin Ther Targets 2006; 10: 677-88.

Lei M, Honjo H, Kodama I, Boyett MR. Heterogeneous expression of the delayed-rectifier K+ currents i(K,r) and i(K,s) in rabbit sinoatrial node cells. J Physiol. 2001 Sep 15;535(Pt 3):703-14.

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 Sep 15;559(Pt 3):835-48.

Lenfant C. Task force on Research in Epidemiology and Prevention of Cardiovascular Diseases. Circulation. 1994 Dec;90(6):2609-17.

Lerner DL, Chapman Q, Green KG, Saffitz JE. Reversible down-regulation of connexin43 expression in acute cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant 2001;20:93–97.

Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K+ current in human ventricular myocytes. Circ Res. 1996 Apr;78(4):689-96.

Li J, Levin MD, Xiong Y, Petrenko N, Patel VV, Radice GL. N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility. J Mol Cell Cardiol. 2008 Mar;44(3):597-606.

Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. J Clin Invest. 1997 Oct 15;100(8):1991-9.

Li Q, Keung EC. Effects of myocardial hypertrophy on transient outward current. Am J Physiol 1994;266:H1738–H1745.

Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, et al. Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human hearts. Cardiovasc Res 1996;31:625–632.

Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial and endocardial myocytes: A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. Circ Res 1995;76:351–365.

Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C. Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. Circ Res. 1993 Mar;72(3):671-87.

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 Feb 15;555(Pt 1):267-79.

Liu Y, Zeng W, Delmar M, Jalife J. Ionic mechanisms of electronic inhibition and concealed conduction in rabbit atrioventricular nodal myocytes. Circulation. 1993 Oct;88(4 Pt 1):1634-46.

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.

Lohrmann E, Burhoff I, Nitschke RB, Lang HJ, Mania D, Englert HC, Hropot M, Warth R, Rohm W, Bleich M, et al. (1995). A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl− secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K+ conductance. Pflüg Arch - Eur J Physiol 429:517–530.

London B, Wang DW, Hill JA, Bennett PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. J Physiol. 1998 May 15;509 (Pt 1):171-82.

Lu H, Fedak PW, Dai X, Du C, Zhou YQ, Henkelman M, Mongroo PS, Lau A, Yamabi H, Hinek A, Husain M, Hannigan G, Coles JG. Integrin-linked kinase expression is elevated in human

cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice. Circulation. 2006 Nov 21;114(21):2271-9.

Lukas A, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia: Role of the transient outward current. Circulation 1993; 88:2903–2915.

Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in Vmax and the transient outward current. Circulation 1992;85:1175–1188.

Ludwig A, Herrmann S, Hoesl E, Stieber J. Mouse models for studying pacemaker channel function and sinus node arrhythmia. Prog Biophys Mol Biol. 2008 Oct-Nov;98(2-3):179-85.

Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. Structure and function of cardiac pacemaker channels. Cell Physiol Biochem. 1999;9(4-5):179-86.

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of ß-agonist stimulation. Circ Res. 1994;75:401-409.

Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. Cardiovasc Res. 1999 Mar;41(3):586-93.

MacRae CA, Birchmeier W, Thierfelder L. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: moving toward mechanism. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1825-8.

Madle A, Linhartova K, Koza J. Effects of the T-type calcium channel blockade with oral mibefradil on the electrophysiologic properties of the human heart. Med Sci Monit 2001;7:74–7.

Mahaim I. Kent fibers and the AV paraspecific conduction through the upper connections of the bundle of His-Tawara. Am Heart J 1947;33:651–653.

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 Mar 18;100(6):3507-12.

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 Jan-Apr;90(1-3):38-63.

Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I(f)) in isolated mouse sino-atrial cells. Cardiovasc Res. 2001 Oct;52(1):51-64.

Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. Circ Res. 2006 Jun 9;98(11):1422-30.

Marban E, Robinson SW, Wier WG: Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. J Clin Invest 1986; 78:1185-92.

Marbán E. Heart failure: the electrophysiologic connection. J Cardiovasc Electrophysiol. 1999 Oct;10(10):1425-8.

Marchi S, Szabo B, Lazzara R. Adrenergic induction of delayed afterdepolarizations in ventricular myocardial cells: Beta-induction and Alpha-Modulation. J Cardiovasc Electrophysiol 1991;2: 476–491.

Marcus F, Towbin JA. The mystery of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: from observation to mechanistic explanation. Circulation. 2006 Oct 24;114(17):1794-5.

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 Jan 1;562(Pt 1):223-34.

Martínez ML, Heredia MP, Delgado C. Expression of T-type Ca(2+) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. J Mol Cell Cardiol. 1999 Sep;31(9):1617-25.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell. 2000 May 12;101(4):365-76.

Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats: an ultrastructural study. J Anat. 1986 Apr;145:133-42.

Matsuda K, Hoshi T, Kamey Ama S. Action of acetylcholine and adrenaline upon the membrane potential of the atrio-ventricular node (Tawara). Tohoku J Exp Med. 1958 Jun 25;68(1):16.

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 Jun;369(6):554-62.

Maylie J, Morad M. Evaluation of T- and L-type Ca2+ currents in shark ventricular myocytes. Am J Physiol. 1995 Nov;269(5 Pt 2):H1695-703.

Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. J Clin Invest. 1990 Jan;85(1):305-9.

McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, Camerini F. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. Br Heart J. 1994 Mar;71(3):215-8.

McNulty MM, Hanck DA. State-dependent mibefradil block of Na+ channels. Mol Pharmacol. 2004 Dec;66(6):1652-61.

Miake J, Marban E, Nuss HB. Gene therapy: biological pacemaker created by gene transfer. Nature 2002;419:132–133.

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. Am J Physiol. 1995 Dec;269(6 Pt 2):H2147-54.

Milnes JT, MacLeod KT. Reduced ryanodine receptor to dihydropyridine receptor ratio may underlie slowed contraction in a rabbit model of left ventricular cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol. 2001 Mar;33(3):473-85.

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.

Mitsuiye T, Guo J, Noma A. Nicardipine-sensitive Na+-mediated single channel currents in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. J Physiol. 1999 Nov 15;521 Pt 1:69-79.

Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. Circ Res. 2000 Jul 21;87(2):88-91.

Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A Computer Model Of Atrial Fibrillation. Am Heart J. 1964 Feb;67:200-20.

Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, Lory P, Nargeot J. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. J Biol Chem. 2000 Jun 2;275(22):16530-5.

Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. Circulation 1990;81.

Moric-Janiszewska E, Markiewicz-Loskot G. Review on the genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Europace. 2007 May;9(5):259-66. Epub 2007 Mar 15.

Morishima M, Wang Y, Akiyoshi Y, Miyamoto S, Ono K. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type Ca2+ channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. Eur J Pharmacol 2009;609:105–12.

Morquio L., 1901. Sur une maladie infantile et familiale characterisee par des modifications permanentes du pouls des attaques syncopales et eptileptiformes et la mort subite. Arch Med Inf 4, pp. 467–469.

Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca(2+)-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. Circulation 1994;90:653–657.

Murakawa Y, Sezaki.K., Yamashita T, Kanese Y, Omata M. Three-dimensional activation sequence of cesium-induced ventricular arrhythmias. Am J Physiol 1997;273:H1377–H1385.

Musa H, Lei M, Honjo H, Jones SA, Dobrzynski H, Lancaster MK, Takagishi Y, Henderson Z, Kodama I, Boyett MR. Heterogeneous expression of Ca(2+) handling proteins in rabbit sinoatrial node. J Histochem Cytochem. 2002 Mar;50(3):311-24.

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. Circulation. 1996 Jan 1;93(1):168-77.

Nakayama T, Kurachi Y, Noma A, Irisawa H. Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. Pflugers Arch. 1984 Nov;402(3):248-57.

Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):219-26.

Nattel S, Euler DE, Spear JF, Moore EN. Autonomic control of ventricular refractoriness. Am J Physiol. 1981 Dec;241(6):H878-82.

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. Physiol Rev. 2007 Apr;87(2):425-56.

Nattel S, Quantz MA. Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarizations in canine cardiac Purkinje fibers: insights into underlying ionic mechanisms. Cardiovasc Res 1988;22:808–817.

Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. Prog Cardiovasc Dis. 2005 Jul-Aug;48(1):9-28.

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. Nov 23;89(11):944-56. Review. 2001.

Nerbonne JM and Kass RS. Physiology and Molecular Biology of Ion Channels Contributing to Ventricular Repolarization. Cardiac Repolarization - Bridging Basic and Clinical Science, 2003. Humana Press. Part II, Chapter 3, p39.

Neuberger HR, Schotten U, Blaauw Y, Vollmann D, Eijsbouts S, van Hunnik A, Allessie M. Chronic atrial dilation, electrical remodeling, and atrial fibrillation in the goat. J Am Coll Cardiol. 2006 Feb 7;47(3):644-53.

Nilius B, Talavera K, Verkhratsky A. T-type calcium channels: the never ending story. Cell Calcium 2006;40:81–8.

Noma A, Irisawa H. Electrogenic sodium pump in rabbit sinoatrial node cell. Pflugers Arch. 1974;351(2):177-82.

Noma A, Nakayama T, Kurachi Y, Irisawa H. Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. Jpn J Physiol. 1984;34(2):245-54.

Nuss HB, Houser SR. T-type Ca2+ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes.Circ Res. 1993 Oct;73(4):777-82.

Nuss HB, Kääb S, Kass DA, Tomaselli GF, Marbán E. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. Am J Physiol. 1999 Jul;277(1 Pt 2):H80-91.

Ono K, Iijima T. Pathophysiological significance of T-type Ca2+ channels: properties and functional roles of T-type Ca2+ channels in cardiac pacemaking. J Pharmacol Sci. 2005 Nov;99(3):197-204.

Oros A, Beekman JD, Vos MA. The canine model with chronic, complete atrio-ventricular block. Pharmacol Ther. 2008 Aug;119(2):168-78.

Osborn JJ. Experimental hypothermia; respiratory and blood pH changes in relation to cardiac function. Am J Physiol. 1953 Dec;175(3):389-98.

Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Bénitah JP, Perrier R, Soukaseum C, Cat AN, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Demolombe S, Mechta-Grigoriou F, Beggah AT, Maison-Blanche P, Oblin ME, Delcayre C, Fishman GI, Farman N, Escoubet B, Jaisser F. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. Circulation. 2005 Jun 14;111(23):3025-33.

Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, et al. Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1997;30:576–584.

Paladino G. Contribuzione all'Anatomia, Istologia e Fisilogia del Cuore. Napoli: Movim Med Chir, 1876.

Pape HC, McCormick DA. Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. Nature 340: 715–718, 1989.

Park KS, Yang JW, Seikel E, Trimmer JS. Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. *Physiology* 23: 49–57, 2008.

Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1998; 274: H1812–H1820.

Patterson E, Scherlag BJ, Lazzara R. Early afterdepolarizations produced by d,l-sotalol and clofilium. J Cardiovasc Electrophysiol 1997;8:667–678.

Patterson E, Scherlag BJ, Szabo B, Lazzara R. Facilitation of epinephrine-induced afterdepolarizations by class III antiarrhythmic drugs. J Electrocardiol 1997;30:217–224.

Perchenet L, Clément-Chomienne O. Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Nov;295(2):771-8.

Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin-43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. Circulation 1997;95:988–996.

Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. Circulation 1993;88: 864–875.

Petit-Jacques J, Bois P, Bescond J, Lenfant J. Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. Pflugers Arch. 1993 Apr;423(1-2):21-7.

Pinto JM, Boyden PA. Electrical remodeling in ischemia and infarction. Cardiovasc Res. 1999 May;42(2):284-97.

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

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 Jul 7;102(1):89-97.

Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovsky EP, Liu L, Janse MJ, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB, Danilo P Jr, Rosen MR. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. Circulation. 2004 Feb 3;109(4):506-12.

Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. Trends Cardiovasc Med. 2004 Feb; 14(2):61-6.

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res. 2001 Jun 8;88(11):1159-67.

Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart: relation to functional IKr channels. J Biol Chem.. 2000; 275: 5997–6006.

Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P Jr, Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR, Cohen IS. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. Circ Res. 2004 Apr 16;94(7):952-9.

Protas L, Robinson RB. Mibefradil, an ICa,T blocker, effectively blocks ICa,L in rabbit sinus node cells. Eur J Pharmacol 2000;401:27–30.

Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res. 2004 Aug 15;63(3):403-13.

Qi X, Yeh YH, Chartier D, Xiao L, Tsuji Y, Brundel BJ, Kodama I, Nattel S. The calcium/calmodulin/kinase system and arrhythmogenic afterdepolarizations in bradycardia-related acquired long-QT syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009 Jun;2(3):295-304.

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 Oct 15;279(42):43497-502.

Qu J, Plotnikov AN, Danilo P Jr, Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB, Rosen MR. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. Circulation. 2003;107:1106 –1109.

Qu Y, Boutjdir M. Gene expression of SERCA2a and L- and T-type Ca channels during human heart development. Pediatr Res. 2001 Nov;50(5):569-74.

Ranjan R, Chiamvimonvat N, Thakor NV, Tomaselli GF, Marban E. Mechanism of anode break stimulation in the heart. Biophys J 1998;74:1850–1863.

Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, and Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. Science 267: 1831–1834, 1995.

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 May;128(10):1785-92.

Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gõmez AM, Bénitah JP. 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. Prog Biophys Mol Biol. 2006 Jan-Apr;90(1-3):118-35.

Rigg L, Heath BM, Cui Y, Terrar DA. Localisation and functional significance of ryanodine receptors during beta-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. Cardiovasc Res. 2000 Nov;48(2):254-64.

Roden DM, Hoffman BF. Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers: Relationship to potassium and cycle length. Circ Res 1986;56:857–867.

Roden DM, Viswanathan PC. Genetics of acquired long QT syndrome. J Clin Invest. 2005; 115: 2025–2032.

Rosen MR. 15th annual Gordon K. Moe Lecture. Biological pacemaking: in our lifetime? Heart Rhythm. 2005 Apr;2(4):418-28.

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 Jan 1;65(1):128-37.

Rubenstein JJ, Schulman CL, Yurchak PM, DeSanctis RW. Clinical spectrum of the sick sinus syndrome. Circulation. 1972; 46: 5–13.

Ryder KO, Bryant SM, Hart G. Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. Cardiovasc Res 1993;27:1278–1287.

Sakai R, Hagiwara N, Matsuda N, Kassanuki H, Hosoda S. Sodium--potassium pump current in rabbit sino-atrial node cells. J Physiol. 1996 Jan 1;490 (Pt 1):51-62.

Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol. 1984;46:455-72.

Sandmann S, Claas R, Cleutjens JP, Daemen MJ, Unger T. Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2001 Jan;37(1):64-77.

Sartiani L, De Paoli P, Stillitano F, Aimond F, Vassort G, Mugelli A, Cerbai E. Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. J Mol Cell Cardiol. 2006 Feb;40(2):258-66.

Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. Methods. 1998 Apr;14(4):381-92.

Schmidt EJ, Mallozzi RP, Thiagalingam A, Holmvang G, d'Avila A, Guhde R, Darrow R, Slavin GS, Fung MM, Dando J, Foley L, Dumoulin CL, Reddy VY. Electroanatomic mapping and radiofrequency ablation of porcine left atria and atrioventricular nodes using magnetic resonance catheter tracking. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009 Dec;2(6):695-704.

Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. Am J Physiol 1999;277:H474–H480.

Schmitt FO, Erlanger J. Directional differences in the conduction of the impulse through heart muscle and their possible relation to extrasystolic and fibrillary contractions. Am J Physiol 1928;87:326–347.

Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, and Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor Nkx2.5. Science 281: 108–111, 1998.

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 May 17;90(9):939-50.

Schrickel JW, Kreuzberg MM, Ghanem A, Kim JS, Linhart M, Andrié R, Tiemann K, Nickenig G, Lewalter T, Willecke K. Normal impulse propagation in the atrioventricular conduction system of Cx30.2/Cx40 double deficient mice. J Mol Cell Cardiol. 2009 May;46(5):644-52.

Schulz DJ, Temporal S, Barry DM, Garcia ML. Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cell Mol Life Sci* 65: 2215–2231, 2008.

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 May;111(10):1537-45.

Schwenk F, Sauer B, Kukoc N, Hoess R, Müller W, Kocks C, Kühn R, Rajewsky K. Generation of Cre recombinase-specific monoclonal antibodies, able to characterize the pattern of Cre expression in cre-transgenic mouse strains. J Immunol Methods. 1997 Sep 24;207(2):203-12.

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. J Mol Cell Cardiol. 1999 Mar;31(3):479-91.

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. Circulation. 2007 Apr 3;115(13):1710-20.

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK, Hughes SE, Merrifield R, Ward D, Pennell DJ, McKenna WJ. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity. J Am Coll Cardiol. 2008 Dec 16;52(25):2175-87.

Severs NJ, Coppen SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. Cardiovasc Res. 2004 May 1;62(2):368-77.

Severs NJ. The cardiac gap junction and intercalated disc. Int J Cardiol. 1990 Feb;26(2):137-73.

Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. Molecular basis of arrhythmias. Circulation. 2005 Oct 18;112(16):2517-29.

Sheikh F, Ross RS, Chen J. Cell-cell connection to cardiac disease. Trends Cardiovasc Med. 2009 Aug;19(6):182-90.

Shibasaki T. Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol* 387: 227–250, 1987.

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 Mar 15;523 Pt 3:593-605.

Shlapakova IN, Nearing BD, Lau DH, Boink GJ, Danilo P Jr, Kryukova Y, Robinson RB, Cohen IS, Rosen MR, Verrier RL. Biological Pacemakers in Canines Exhibit Positive Chronotropic Response to Emotional Arousal. Heart Rhythm. 2010 Aug 10.

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 Jun;282(6):H2076-83.

Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. Curr Biol. 1998 Feb 26;8(5):295-8.

Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. Am J Pathol 1991;139:801–821.

Song Y, Belardinelli L. ATP promotes development of afterdepolarizations and triggered activity in cardiac myocytes. Am J Physiol 1994;267:H2005–H2011.

Sridharan MR, Horan LG. Electrocardiographic J wave of hypercalcemia. Am J Cardiol. 1984 Sep 1;54(6):672-3.

Stern MD, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? Cell Calcium. 2004 Jun;35(6):591-601.

St-Onge L, Furth PA, Gruss P. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. Nucleic Acids Res. 1996 Oct 1;24(19):3875-7.

Struthers AD. Introducing a new role for BNP: as a general indicator of cardiac structural disease rather than a specific indicator of systolic dysfunction only. Heart. 2002 Feb;87(2):97-8.

Szabo B, Kovacs T, Lazzara R. Role of calcium loading in early afterdepolarizations generated by Cs in canine and guinea pig Purkinge fibers. J Cardiovasc Electrophysiol 1995;6:796–812.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. Cardiovasc Res. 2004 Apr 1;62(1):9-33.

Ten Eick RE, Zhang K, Harvey RD, Bassett AL. Enhanced functional expression of transient outward current in hypertrophied feline myocytes. Cardiovascular Drugs & Therapy 1993;3:611–619.

Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, Cogé F, Piffard L, Guillaumin JP, Brunel-Jacquemin C, Chomarat P, Boutin JA, Peglion JL, Vilaine JP. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. Br J Pharmacol. 2007 Jan;150(1):37-46.

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 May;112(1):37-42.

Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, and Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. Circulation 97: 686–691, 1998.

Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmbhatt B, Brown K, Bauce 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 Feb 1;10(3):189-94.

Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res. 1999 May;42(2):270-83.

Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. Circ Res (2001) 89:437–444.

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS, Singh K. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. Circ Res. 2001 May 25;88(10):1080-7.

Tsuji Y, Opthof T, Yasui K, Inden Y, Takemura H, Niwa N, Lu Z, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. Circulation. 2002 Oct 8;106(15):2012-8.

Ueyama T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Nakamura Y, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Alterations in cardiac SR Ca(2+)-release channels during development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. Am J Physiol. 1998 Jan;274(1 Pt 2):H1-7.

Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. 2001. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. Am. Heart J. 141:334–41.

van Opstal JM, Verduyn SC, Leunissen HD, de Groot SH, Wellens HJ, Vos MA. Electrophysiological parameters indicative of sudden cardiac death in the dog with chronic complete AV-block. Cardiovasc Res. 2001 May; 50(2):354-61.

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 Mar 20;103(11):1591-8.

van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. Cardiovasc Res. 2001 Aug 1;51(2):217-29.

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 Sep 27;112(13):1927-35. Epub 2005 Sep 19.

Vassort G, Talavera K, Alvarez JL. Role of T-type Ca2+ channels in the heart. Cell Calcium. 2006 Aug;40(2):205-20.

Vatner DE, Sato N, Kiuchi K, Shannon RP, Vatner SF. Decrease in myocardial ryanodine receptors and altered excitation-contraction coupling early in the development of heart failure. Circulation 1994;90:1423–1430.

Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. J Cardiovasc Electrophysiol. 1999 Oct;10(10):1380-9.

Verkerk AO, Wilders R, van Borren MM, Tan HL. Is sodium current present in human sinoatrial node cells? Int J Biol Sci 2009;5:201–4.

Vermeulen JT. Mechanisms of arrhythmias in heart failure. J Cardiovasc Electrophysiol 1998;9:208–221.

Vermeulen JT, McGuire MA, Opthof T, et al. Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts. Cardiovasc Res 1994;28:1547–1554.

Vinogradova TM, Zhou YY, Bogdanov KY, Yang D, Kuschel M, Cheng H, Xiao RP. Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. Circ Res. 2000 Oct 27;87(9):760-7.

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 Jan 11;90(1):73-9.

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

Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of IKr and IKs heterogeneity on action potential duration and its rate dependence: a simulation study. Circulation. 1999 May 11;99(18):2466-74.

Volders PGA, Kulcsar A, Vos MA, et al. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. Cardiovasc Res 1997;34:348–359.

Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Kulcsar A, Verduyn SC, Wellens HJ. Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. Circulation 1998;98:1136–1147.

Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RL, Wellens HJ, Vos MA. Repolarizing K+ currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. Circulation 1999;99: 206–210.

Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, et al. 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 1998;98:1125–1135.

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.

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, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, et al., Mouse Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature. 2002 Dec 5;420(6915):520-62.

Weber CR, Ginsburg KS, Bers DM. Cardiac submembrane [Na+] transients sensed by Na+-Ca2+ exchange current. Circ Res. 2003 May 16;92(9):950-2.

Wehrens XH. The molecular basis of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: what are the different hypotheses regarding mechanisms? Heart Rhythm. 2007 Jun;4(6):794-7.

White DE, Coutu P, Shi YF, Tardif JC, Nattel S, St Arnaud R, Dedhar S, Muller WJ. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. Genes Dev. 2006 Sep 1;20(17):2355-60.

WHO Cardiovascular Diseases - http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html (2007) Accessed October 2008.

Winslow RL, Rice J, Jafri S, Marbán E, O'Rourke B. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, II: model studies. Circ Res 1999;84:571–586.

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. J Biol Chem. 1991 Jun 15;266(17):11144-52.

Wolf CM, Berul CI. Molecular mechanisms of inherited arrhythmias. Curr Genomics. 2008 May;9(3):160-8.

Wolska BM, Stojanovic MO, Luo W, Kranias EG, Solaro RJ. Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular calcium under basal conditions and during ß-adrenergic stimulation. Am J Physiol. 1996;271:391-397.

Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. Ionic basis of a differential effect of adenosine on refractoriness in rabbit AV nodal and atrial isolated myocytes. Cardiovasc Res. 1999 Sep;43(4):974-84.

Wu J, Schuessler RB, Rodefeld MD, Saffitz JE, Boineau JP. Morphological and membrane characteristics of spider and spindle cells isolated from rabbit sinus node. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Mar;280(3):H1232-40.

Wu J, Cheng L, Lammers WJ, Wu L, Wang X, Shryock JC, Belardinelli L, Lei M. Sinus node dysfunction in ATX-II-induced in-vitro murine model of long QT3 syndrome and rescue effect of ranolazine. Prog Biophys Mol Biol. 2008 Oct-Nov;98(2-3):198-207.

Xiao GQ, Hu K, Boutjdir M. Direct inhibition of expressed cardiac l- and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block. Circulation. 2001 Mar 20;103(11):1599-604.

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 Sep 27;91(20):9659-63.

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 Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, and Robbins J. In vivo modeling of myosin binding protein C familial hypertrophic cardiomyopathy. Circ Res 85: 841–847, 1999.

Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M, Noguchi N, Takasawa S, Okamoto H, Matsuzaki M. Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. Circulation. 2000 Oct 24;102(17):2131-6.

Yao X, Kwan HY, Huang Y. Regulation of TRP channels by phosphorylation. *Neurosignals* 14: 273–280, 2005.

Yokokawa M, Ohnishi S, Ishibashi-Ueda H, Obata H, Otani K, Miyahara Y, Tanaka K, Shimizu W, Nakazawa K, Kangawa K, Kamakura S, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells improves atrioventricular conduction in a rat model of complete atrioventricular block. Cell Transplant. 2008;17(10-11):1145-55.

Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current exists in ventricular myocytes. Circ Res. 1993 Jan;72(1):232-6.

Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current I(f) in adult canine cardiac ventricular myocytes. J Physiol. 1995 Jun 1;485 (Pt 2):469-83.

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 Jan 27;101(4):1051-6.

Yusuf S, Camm AJ. The sinus tachycardias. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2005 Jan;2(1):44-52.

Yuan W, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. Am J Physiol. 1994 Sep;267(3 Pt 2):H982-93.

Zeng J, Rudy Y. Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. Biophys J 1995;68:949–964.

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem. 1997 Sep 12;272(37):23389-97.

Zhang LM, Wang Z, Nattel S. Effects of sustained beta-adrenergic stimulation on ionic currents of cultured adult guinea pig cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Mar;282(3):H880-9.

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. Circ Res. 2003; 92: 912–919.

Zhang Z, He Y, Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Zhang Q, Glatter KA, Xu Y, Shin HS, Low R, Chiamvimonvat N. Functional roles of Cav1.3 (alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. Circulation. 2005 Sep 27;112(13):1936-44. Epub 2005 Sep 19. Erratum in: Circulation. 2005 Oct 25;112(17):e296.

Zhou Z, Lipsius SL. T-type calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. J Mol Cell Cardiol. 1994 Sep;26(9):1211-9.

Zicha S, Fernández-Velasco M, Lonardo G, L'Heureux N, Nattel S. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model. Cardiovasc Res. 2005 Jun 1;66(3):472-81.

Zipes DP. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias: role of the autonomic nervous system. Cleve Clin J Med. 2008 Mar;75 Suppl 2:S94-6.

Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. Circulation. 1998 Nov 24;98(21):2334-51.

Zivin A, Mehra R, Bardy GH. Cardiac pacemakers. In: Spooner PM, Rosen MR, eds. Foundations of Cardiac Arrhythmias. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 2001:571–598.

Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. Cor Vasa. 1978; 20: 308–314.

Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM. INaCa and ICl(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed afterdepolarizations in midmyocardial cells. Am J Physiol 1998;275:H1979–H1992.

RÉSUMÉ et MOTS CLÉS

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'hypertrophie cardiaque est un processus de remodelage provoqué par une surcharge de travail du muscle cardiaque afin de mieux répondre à la demande de l'organisme. Bien que bénéfique à court terme, une hypertrophie trop accentuée conduira à long terme, à une insuffisance cardiaque. L'hypertrophie est associée à un remodelage électrique qui conduit généralement à un allongement du potentiel d'action, une des causes des arythmies ventriculaires et de la mort subite. Généralement, le mécanisme causal est la fibrillation ventriculaire, un trouble du rythme irréversible dont les mécanismes sont complexes et méconnus. Si les conséquences fonctionnelles *in vitro* des mutations génétiques ou du remodelage ionique sont relativement simples à étudier ou à prévoir, leur rôle dans les mécanismes des troubles du rythme *in vivo* sont plus difficiles à appréhender. Parmi les nombreux modèles animaux développés pour la recherche sur les troubles du rythme, la souris est de plus en plus utilisée en raison de notre capacité à muter, invalider ou sur-exprimer les gènes d'intérêt chez ces animaux. L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques en physiopathologie cardiaque, en particulier dans la survenue des troubles du rythme *in vivo*. Ces travaux ont permis d'améliorer notre connaissance du rôle des anomalies génétiques impliquant des canaux ioniques et du remodelage ionique dans la physiopathologie des troubles du rythme et pourrait ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement anti-remodelage cardiaque et la prévention de la mort subite.

Mots-clés : souris transgénique, remodelage cardiaque, infarctus du myocarde, bloc auriculo-ventriculaire, fibrillation auriculaire, tachycardie ventriculaire, canaux ioniques, mort subite.

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the world each year. If no action is taken to improve cardiovascular health and current trends continue, WHO estimates that 25% more healthy life years will be lost to cardiovascular disease globally by 2020. Cardiac hypertrophy is the consequence of an excessive workload of the heart muscle leading to cardiac remodeling process. As the workload increases, the ventricular walls grow thicker, lose elasticity and eventually may fail to pump with as much force as a healthy heart. Furthermore, hypertrophied myocardium is not physiologically normal and may confer a predisposition to potentially fatal arrhythmias. Generally, the causal mechanism is ventricular fibrillation, a cardiac rhythm disorder which is irreversible but the pathophysiological mechanisms are complex and poorly understood. The functional consequences of mutations or ionic remodeling are relatively simple to study *in vitro*, but their role in the pathophysiology of arrhythmias in vivo is more difficult to grasp. Among the different animal models developed in cardiac arrhythmias research, the mouse is increasingly used because of our ability to mutate, knock-out or over-express genes of interest. The objective of my thesis was to study the role of ion channels in physiology as well as cardiac pathophysiology, particularly in the involvement of the occurrence of cardiac arrhythmias *in vivo*. This thesis will improve our understanding of the role of genetic abnormalities involving ionic remodeling in the pathogenesis of the heart and may also open new therapeutic perspectives in the treatment of cardiac remodeling as well as sudden cardiac death.

Key-words: transgenic mouse, cardiac remodeling, myocardial infarction, complete heart block, atrial fibrillation, ventricular tachycardia, ionic channels, sudden death.